

**DIE GENETISCHE AKTIVITÄT DER RIESEN-
CHROMOSOMEN IN DER LARVALEN SPEICHEL-
DRÜSE VON DROSOPHILA VIRILIS: IHRE
VERÄNDERUNG IN DER NORMALENTWICKLUNG
UND IHRE EXPERIMENTELLE BEEINFLUSSUNG
DURCH METABOLITE DES GLUCOSAMIN-
STOFFWECHSELS UND DURCH ECDYSON**

Horst Kreß

1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553801_0083

DIE GENETISCHE AKTIVITÄT DER RIESENCHROMOSOMEN IN
DER LARVALEN SPEICHELDRÜSE VON DROSOPHILA VIRILIS:
IHRE VERÄNDERUNG IN DER NORMALENTWICKLUNG UND IHRE
EXPERIMENTELLE BEEINFLUSSUNG DURCH METABOLITE DES
GLUCOSAMINSTOFFWECHSELS UND DURCH ECDYSON

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig - Maximilians - Universität
zu München

vorgelegt
von
Horst Kreß
aus
München

Oktober 1971



1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.J. Becker
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. F.Kaudewitz
- Tag der mündlichen Prüfung: 15. 12. 1971

Herrn Prof. Dr. H.J. Becker danke ich herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit und für viele fördernde Diskussionen. Die Untersuchungen wurden durch ein Stipendium des CUSANUSWERKS aus Mitteln der Stiftung Volkswagenwerk unterstützt.

INHALT

Seite

A) Einleitung.....	1
B) Material und Methoden	
I) Altersbestimmung der Larven.....	5
II) Nachweis der aktiven Genorte	
1) Präparation und Färbung der Chromosomen.....	8
2) Klassifizierung der genetischen Aktivität....	9
3) Die Chromosomenkarte.....	10
III) Schnürungsexperimente.....	11
IV) Sekretausschüttung.....	12
V) Injektionsexperimente.....	13
C) Ergebnisse	
I. Teil: Normalentwicklung	
1) Der Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung..	14
2) Der zeitliche Ablauf der Sekretausschüttung.....	23
3) Das Puffmuster und seine Veränderungen.	25
4) Diskussion.....	29
II. Teil: Injektionsexperimente	
1) Substanzunspezifische Injektionseffekte	
a) Beeinflussung des Zeitpunkts der Ecdysonausschüttung.....	39
b) Die Reaktion des Puffmusters auf die Injektion.....	41
2) Substanzspezifische Effekte	
a) Injektion von Ecdyson.....	49
b) Injektion von Metaboliten des Glucosaminstoffwechsels und von Azaserin.....	50
3) Diskussion.....	52
D) Zusammenfassung.....	67
Literatur.....	71

A) Einleitung

In den letzten zehn Jahren ist die Regulation der Genexpression zu einem zentralen Problem der Molekularbiologie geworden. Tieferer Einblicke in die damit verbundenen Vorgänge wurden zunächst an Mikroorganismen gewonnen, die als relativ einfache biologische Systeme einer experimentellen Analyse leichter zugänglich sind. Das Ergebnis all dieser Bemühungen waren u.a. die grundlegenden Konzeptionen des Operons als Regulationseinheit im Genom (1) und der allosterischen Wechselwirkungen (2).

Bei Metazoen konnten die bei Mikroorganismen vorgefundenen Mechanismen nur teilweise nachgewiesen werden. So gibt es z.B. bis heute noch keinen Hinweis für die Existenz von Operons bei höheren Organismen (3). Neben methodischen Schwierigkeiten ist es vor allem der wesentlich komplexere Organisationsgrad der Metazoen, der die Aufklärung von Regulationsmechanismen in diesen Systemen erschwert. So liegen in einer Säugerzelle gegenüber einer Bakterienzelle charakteristische Komponenten wie DNA, RNA, Protein und Ribosomen durchschnittlich in einer um den Faktor 1000 gesteigerten Quantität vor (4). Ein weiteres unterscheidendes Merkmal, das auf komplizierte Verhältnisse bei Metazoen schließen läßt, ist die Stabilität der m-RNA. Bei Mikroorganismen beträgt die durchschnittliche Lebensdauer von messenger-

Molekülen 2-3 min (5). Deren Konzentration in der Zelle ist somit korreliert mit ihrer Syntheserate, so daß in diesen Organismen die Regulation der Proteinsynthese im wesentlichen von der Regulation der Transkription abhängig ist. Bei Vielzellern dagegen kann die Lebensdauer von m-RNA sehr lang sein. Dies gilt im besonderen für hochspezialisierte Zellen, deren Funktion in der Produktion von einem oder wenigen Proteinen besteht, z.B. für Erythrozyten (6), Cocoonase-produzierende Zellen in den Galeae von Seidenspinnern (7) oder Speicheldrüsen von Dipteren (8). Die Halbwertszeiten der m-RNA dieser Zellen liegen in der Größenordnung von Tagen. Die extreme Langlebigkeit dieser m-RNA erfordert spezielle Mechanismen, die deren Aktivität auf der Translationsebene regulieren.

Die Verschiedenartigkeit der Organisation kommt weiterhin in der Tatsache zum Ausdruck, daß bei höheren Organismen funktionsfähige m-RNA nicht direkt bei der Transkription entsteht, wie dies bei Bakterien der Fall ist. Vielmehr werden zunächst sehr große RNA-Moleküle abgelesen, aus denen auf dem Weg vom Kern ins Cytoplasma wahrscheinlich durch Abspalten bestimmter Teilstücke die zur Translation fähigen m-RNA-Moleküle entstehen (9, 10).

In höheren Organismen scheint somit die Regulation der Proteinbiosynthese auf transkriptioneller Ebene nicht die dominierende Rolle zu spielen, die ihr bei Mikroorganismen zukommt. So konnte bis heute nur von

bestimmten Drogen, Diäten und Hormonen gezeigt werden, daß ihre Wirkung zum Teil auf der Induktion der RNA-Synthese beruht (3, 4).

Die Fähigkeit einzelner Metabolite, die RNA-Synthese zu beeinflussen, konnte bei Metazoen noch nicht nachgewiesen werden. Dies ist vor allem auf methodische Schwierigkeiten zurückzuführen. Schwierigkeiten dieser Art werden stark reduziert, wenn als Untersuchungsobjekt Riesenchromosomen verwendet werden. Diese Chromosomen, die bisher bei Pflanzen, Protozoen, Collembolen und Dipteren beschrieben wurden (11), zeichnen sich dadurch aus, daß die genetische Aktivität bestimmter Querbanden mit der Auflösung ihrer Struktur verbunden ist. Eine derartige Strukturmodifikation wird als "puff" bezeichnet, die Erscheinung ihres Auftretens allgemein als "puffing". Mit Hilfe autoradiographischer Methoden oder bestimmter Färbungen läßt sich die Synthese bzw. Akkumulation von RNA in diesen Puffs nachweisen (12). Die Beeinflussung der genetischen Aktivität dieser Chromosomen durch Hormone, Pharmaka oder Metabolite kann somit direkt am Mikroskop geprüft werden.

Am eingehendsten wurden bisher die Riesenchromosomen der larvalen Speicheldrüsen von Dipteren untersucht. Trotz intensiver Bemühungen ist es jedoch auch hier nicht gelungen jene Faktoren zu bestimmen, die für die vielfältigen Veränderungen genetischer Aktivität verantwortlich sind, die im Laufe der Entwicklung an diesen Chromosomen zu beobachten sind. Allein für das Häutungshormon

Ecdyson ist mit Sicherheit nachgewiesen, daß es im Experiment in einer Reihe von Dipterenarten Änderungen von Puffaktivitäten induziert (11), die auch in bestimmten Phasen der Normalentwicklung auftreten. Da die entwicklungsphysiologische Funktion des Ecdysons bekannt ist (34), lassen sich die durch das Hormon induzierten Veränderungen des Puffmusters in biologisch sinnvoller Weise interpretieren. Es konnte allerdings noch nicht geklärt werden, ob der primäre Angriffspunkt des Ecdysons das Genom ist oder bestimmte Faktoren des zellinternen Milieus. Hinweise für die Existenz von "zellinternen Faktoren", die einen Einfluß auf die Aktivität des Genoms ausüben und deren Wirkung möglicherweise von früheren hormonellen Effekten abhängig ist, wurden von Bultman und Clever angeführt (13).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, in den larvalen Speicheldrüsen von *Drosophila virilis* nicht-hormonale Faktoren zu finden, die Veränderungen des Puffmusters induzieren können. Es wurde dabei in erster Linie an Metabolite gedacht, die für den Stoffwechsel der Speicheldrüse charakteristisch sind.

Die Untersuchungen wurden an Larven des späten dritten Larvenstadiums durchgeführt. In diesem Entwicklungsabschnitt besteht bei *Drosophila* die Hauptfunktion der Drüse in der Synthese eines Sekrets (14), das auf Grund seiner biochemischen Zusammensetzung (15, 16, 17) und seiner histochemischen Eigenschaften (14, 17) als Mucoprotein identifiziert wurde. Generell bestehen Mucoproteine aus

einer Proteinkomponente und einer Zuckerkomponente. Bei *Drosophila* konnte als Bestandteil der Zuckerkomponente u.a. Glucosamin nachgewiesen werden (15, 17). Wie in der Diskussion näher ausgeführt werden soll, liegen gewisse Hinweise vor, die dafür sprechen, daß in den Speicheldrüsen von *Drosophila* die Synthese der aminierten Monosaccharide, die als Bausteine der Zuckerkomponente dienen, über jene Reaktionskette erfolgt, die, von Fructose-6-phosphat ausgehend, zu UDP-N-Acetylglucosamin führt.

Es wurden deshalb vier verschiedene Metabolite dieser Reaktionskette auf ihre Fähigkeit untersucht, die genetische Aktivität der Riesenchromosomen der larvalen Speicheldrüse zu beeinflussen: Fructose-6-phosphat, Glutamin, Glucosamin und N-Acetylglucosamin. Des weiteren wurde Azaserin getestet. Diese Substanz ist ein Inhibitor des Enzyms Glutamin-Fructose-6-phosphat-transaminase, das den ersten Schritt der gesamten Reaktionskette katalysiert.

Ergänzend zu diesen Versuchen wurde auch die Veränderung des Puffmusters durch Injektion von Ecdyson untersucht.

Die Darstellung der Ergebnisse der Arbeit ist in zwei Teile gegliedert. Im ersten Teil werden Vorgänge in der Normalentwicklung beschrieben, im zweiten Teil die experimentellen Befunde.

B) Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an weiblichen Larven eines *Drosophila virilis*-Wildstammes aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen durchgeführt. In den Fällen, in denen sowohl männliche als auch weibliche Larven verwendet wurden, ist darauf hingewiesen. Die Tiere wurden in 0,2 l-Joghurtgläsern über einem Nährmedium aus Maisgrieß, Rübensirup, Agar, getrockneter Bierhefe und Wasser gehalten, dem etwas Nipagin zugesetzt war. In jedem Zuchtgefäß befanden sich 55 weibliche und 65 männliche Fliegen. Da sich in vorhergehenden Tests gezeigt hatte, daß die Eiablage hauptsächlich in den Abendstunden erfolgt, wurden die Larven, mit denen Experimente durchgeführt werden sollten, aus Eiern großgezogen, die im Zeitraum von 19-21 Uhr abgelegt worden waren. Die Aufzucht der Larven und die Experimente erfolgten, wenn nicht anders angegeben, bei $\sim 25^{\circ}\text{C}$.

I) Altersbestimmung

Von den Eiern ausgehend erfolgt die Entwicklung über drei Larvenstadien und dem sich anschließenden Puppenstadium. Gegen Ende des dritten Larvenstadiums verlassen die Larven das Futter, kriechen an der Wand des Zuchtgefäßes empor und bereiten sich auf die Pupariumbildung vor, die wenige Stunden später erfolgt (Fig.1). Die Rate, mit der die Larven das Futter verlassen, ist abhängig von der Populationsdichte (Fig.2). Bei einer Dichte von 250-300 Larven/Glas verließen in der Stunde durchschnittlich 15-16 Larven das Futter. Der zeitliche Abstand zwischen

Fig. 1

Zeitlicher Ablauf des Hochkriechens der Larven
(männliche und weibliche) und der Pupariumbildung.
Als Kriterium für die Pupariumbildung galt das Aus-
stülpen der vorderen Spirakel.

Ordinate: Tiere, die das Futter verlassen haben (Kurve I)
und Anzahl der in Kurve I dargestellten Tiere,
die das Puparium gebildet haben (Kurve II).

links: absolute Anzahl,

rechts: in Prozenten der im Glas vorhandenen
Anzahl von Larven ($= n_{Pop}$).

Abszisse: Stunden nach Eiablage.

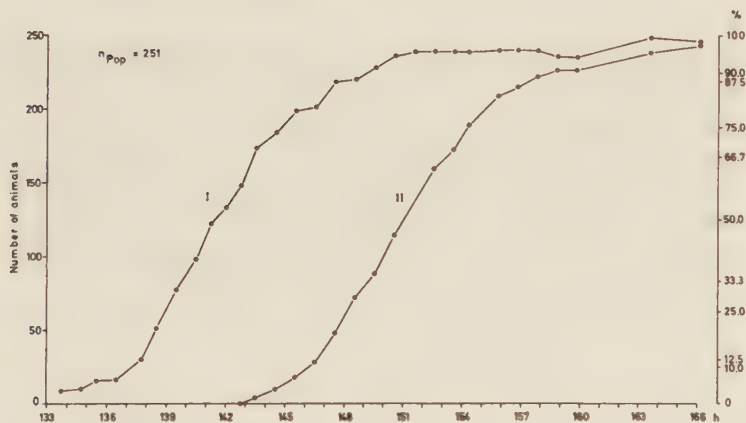


Fig. 2

Abhängigkeit der durchschnittlichen Rate des Hochkriechens der Larven (Ordinate) von der Populationsdichte (Abszisse). Jeder Punkt wurde aus einem der Fig. 1 entsprechenden Diagramm gewonnen. Die durchschnittliche Rate wurde aus den Werten der Kurve I im Bereich zwischen 10 und 90 % berechnet.

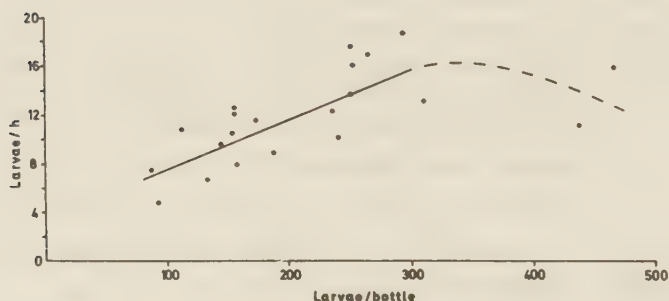
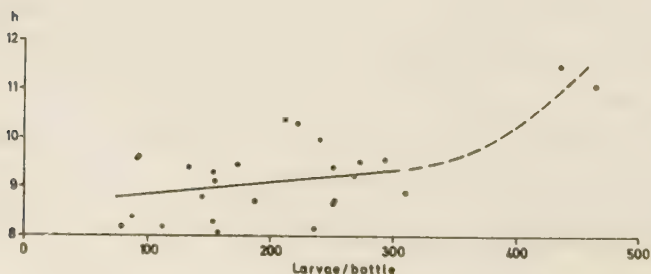


Fig. 3

Abhängigkeit des zeitlichen Abstandes zwischen dem Hochkriechen der Larven und der Pupariumbildung (Ordinate) von der Populationsdichte (Abszisse). Jeder Punkt ist das Mittel von sieben Messungen des zeitlichen Abstandes zwischen den Kurven I und II eines der Fig. 1 entsprechenden Diagramms. Die Messungen wurden auf dem Niveau von 12,5; 25,0; 33,3; 50,0; 66,7; 75,0 und 87,5 % (siehe Fig. 1, rechte Ordinate) durchgeführt.



dem Hochkriechen und der Pupariumbildung war im Bereich bis 300 Larven/Glas annähernd konstant (Fig.3); im Durchschnitt betrug er 9,1h. Aus der Konstanz des zeitlichen Abstandes wurde geschlossen, daß das Hochkriechen der Larven, ebenso wie die Pupariumbildung, zu einem genau festgelegten Zeitpunkt in der Entwicklung der Larven erfolgt. Basierend auf dieser Annahme, wurde eine Altersbestimmung der Larven durchgeführt, indem der Zeitpunkt des Hochkriechens als Nullpunkt einer Zeitskala festgelegt wurde.

Für die Gewinnung altersbestimmter Larven wurden speziell dafür geeignete Zuchtgefäße angefertigt, die ein schnelles Absammeln von Larven gewährleisteten, die im Zeitraum von zwei Stunden das Futter verlassen hatten. In jedes Zuchtglas wurden 250-300 frisch abgelegte Eier eingezählt; auf diese Weise waren in dem 2-stündigen Intervall möglichst viele Larven zu erwarten (Fig.2). Bei derartig gewonnenen Larven trat die Pupariumbildung durchschnittlich 9,1h nach dem Verlassen des Futters ein (Fig.4). Die Standardabweichung läßt sich aus der Kurve mit $\pm 1,6h$ abschätzen. Im Vergleich zur gesamten Entwicklungsdauer, die bis zur Pupariumbildung ungefähr 150h beträgt, ist die beobachtete zeitliche Altersstreuung sehr gering. Die angewendete Methode ist daher zur Altersbestimmung der Larven geeignet. Das Alter der Larven wird im Folgenden immer in Stunden "nach dem Hochkriechen" (= n.d.H.) angegeben.

Der in diesen Vorversuchen erhaltene Wert von 9,1h gilt nur für die Bedingungen dieser Versuchsreihe. In den

Fig. 4

Zeitpunkt der Pupariumbildung bei männlichen und weiblichen Larven, die beim Verlassen des Futters abgesammelt wurden.

Ordinate: Anteil der Larven, die ein Puparium gebildet haben.

Abszisse: Stunden nach dem Hochkriechen. Der Zeitpunkt Null ist die Mitte des 2-stündigen Intervalls, in dem die Larven das Futter verlassen hatten.

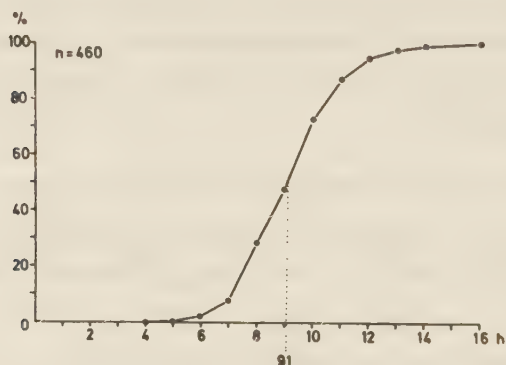
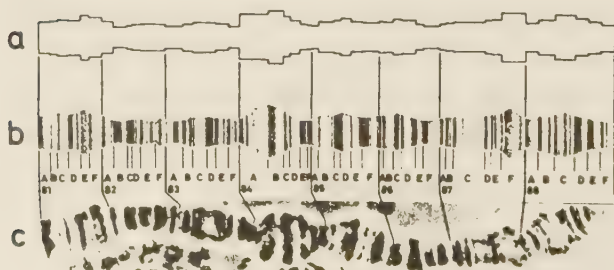


Fig. 5

Das distale Ende des V. Chromosoms.

- a) Umrißschema, zusammengesetzt aus den Unterabschnitten mit ihren mittleren Längen und Breiten;
- b) die fertige Chromosomenkarte;
- c) Photographie des Chromosomenendes.



später durchgeführten Hauptversuchen wurden sowohl die Temperatur als auch die Futterzusammensetzung etwas modifiziert. Dementsprechend trat die Pupariumbildung jeweils zu einem anderen Zeitpunkt ein.

II) Nachweis der aktiven Genorte

Die Problemstellung erforderte eine möglichst vollständige Erfassung aller aktiven Genorte. Es erschien dafür die Färbung mit Methylgrün-Pyronin am geeignetsten. Unter bestimmten Bedingungen ermöglicht diese Methode eine differentielle Färbung von RNA- und DNA-haltigen Strukturen u.a. auch in Riesenchromosomen (18-20), und somit eine Unterscheidung zwischen aktiven und inaktiven Chromosomenabschnitten.

1) Präparation und Färbung der Chromosomen

Die Speicheldrüsen wurden in einer 7,2 %-igen Saccharoselösung freipräpariert. Nach 5-minütigem Fixieren in einem Gemisch von 55%-iger Essigsäure und 96 %-igem Äthanol (1:3) wurden die Drüsen in einem Tropfen 45 %-iger Essigsäure unter einem Deckglas gequetscht. Das Absprengen des Deckglases erfolgte nach dem Gefrieren des Objektträgers in einem Gemisch aus CO₂-Schnee und Methanol. Sofort nach dem Absprengen wurde der noch kalte Objektträger in 100 %-igen Isopropanol überführt, von dort über eine Alkoholreihe in Wasser und daran anschließend in die Farblösung gebracht. Nach 2-3 stündigem Färben bei Zimmertemperatur wurde das Präparat bei 30°C in t-Butanol gespült und in Euparal eingedeckt.

Für das Farbstoffgemisch wurden Methylgrün der Firma Merck, Darmstadt und Pyronin GS der Chroma-Gesellschaft, Stuttgart verwendet. Nach dem Ansatz der 2 %-igen wäßrigen Lösungen mußten diese mit Chloroform im Scheidetrichter gewaschen werden. Die Mischung erfolgte erst bei der Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung. Dazu wurden 3,2 ml Pyroninlösung, 1,8 ml Methylgrünlösung, 25 ml Mc Ilvaine-Puffer, pH 5,8 und 20 ml H₂O dest. miteinander gemischt.

2) Klassifizierung der Puffaktivitäten

Bei der Auswertung der Präparate wurden die verschiedenen Aktivitätsgrade der Banden klassifiziert. Nach den Untersuchungen von Pelling (12) kann man die Größe eines Puffs als relatives Maß für seinen RNA-Gehalt betrachten. Es wurden deshalb zur Abschätzung der relativen genetischen Aktivität, d.h. des relativen RNA-Gehalts einzelner Querscheiben, die einzelnen Klassen jeweils durch einen Aktivitätsindex charakterisiert. Jeder Puffaktivität wurde eine bestimmte Anzahl von Aktivitätseinheiten (activity units = AU) zugeordnet:

Klasse (Anzahl AU)	Charakterisierung
0	Querscheibe blau gefärbt
1	Querscheibe violett gefärbt
2	Qu. violett gefärbt, diffus
3	Qu. violett-rot gefärbt
4	Qu. violett-rot gefärbt, diffus
5	Qu. rot gefärbt
6	Qu. rot gefärbt, diffus

7	Qu.violett-rot gefärbt, stark diffus
8	Qu.rot gefärbt, stark diffus
9	Qu.rot gefärbt, beginnende Puffbildung
10	Qu.violett-rot gefärbt, großer Puff
11	Region rot gefärbt, mittलगroßer Puff
12	Region rot gefärbt, großer Puff
13	Region rot gefärbt, sehr großer Puff

Diese Betrachtungsweise läßt zwar keine Schlüsse auf die wirkliche genetische Aktivität des Genoms zu, ermöglicht aber dennoch gewisse Aussagen über die Veränderungen seiner Aktivität im Laufe der Entwicklung. Für die exakte Klassifizierung wurde neben der Betrachtung im normalen Durchlicht die unterschiedliche Transmission aktiver Banden im Rotlicht (645 nm) und im Grünlicht (510 nm) zu Hilfe genommen. Die oben definierten Klassen tragen sowohl dem Verhältnis von Rot- und Blaufärbung innerhalb einer aktiven Bande als auch deren morphologischer Ausdehnung Rechnung. In Abbildung 1 sind für einige der 14 Aktivitätsklassen Beispiele als solche angegeben.

3) Die Chromosomenkarte

Es standen drei verschiedene Karten der Speicheldrüsenchromosomen von *D.virilis* zur Verfügung (21-23). Da in diesen Karten die dargestellten Chromosomen ~~dem tatsächlichen morphologischen Bild nur wenig entsprachen,~~ wurde es als zweckmäßig empfunden, eine Karte zu entwerfen, die eine schnellere Durchmusterung der Chromosomen

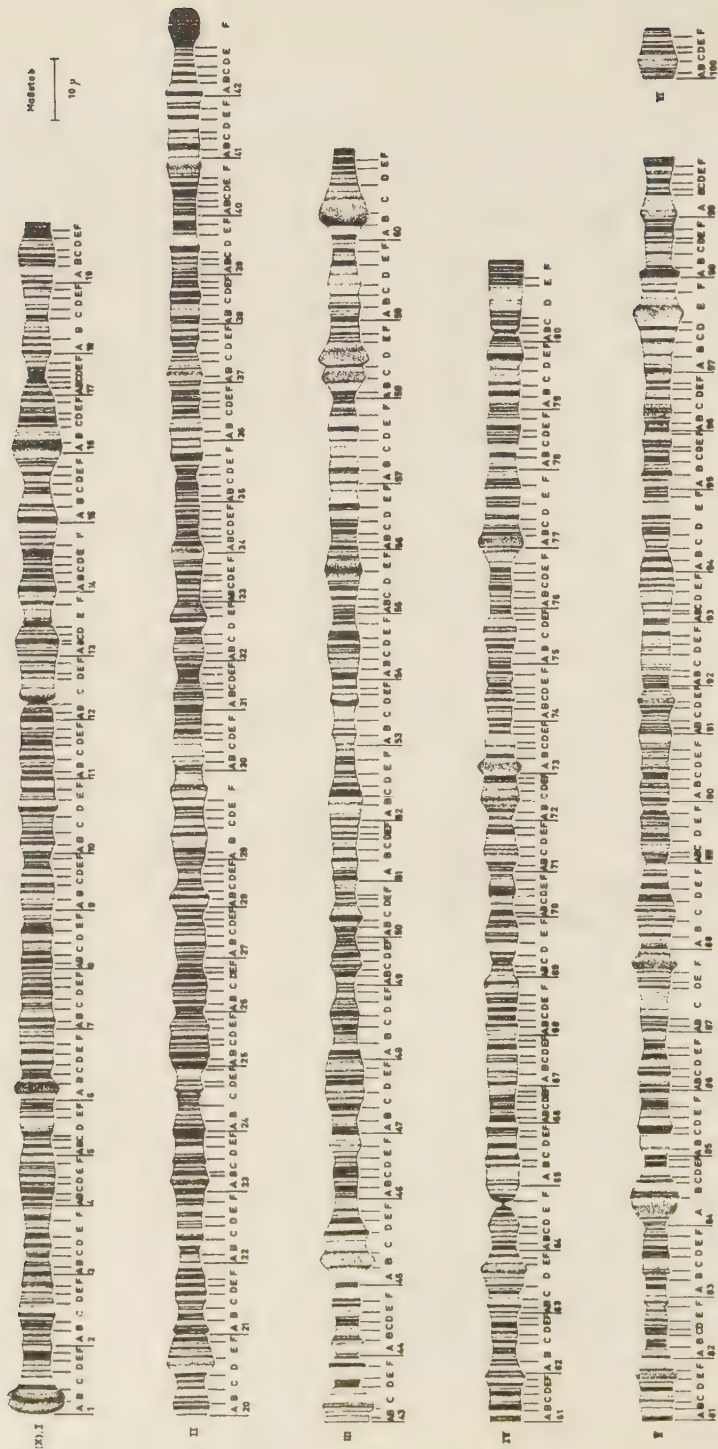
dem tatsächlichen morphologischen Bild nur wenig entsprachen, wurde als zweckmäßig empfunden, eine Karte zu entwerfen, die eine schnellere Durchmusterung der Chromosomen ermöglichte. Als Arbeitsmaterial dienten Phasenkontrastphotographien von Chromosomen in ungefärbten Quetschpräparaten. Die Drüsen stammten von Larven, die zwei Stunden vor der Präparation das Futter verlassen hatten. Die Grenzen der Chromosomenabschnitte (Zahlen) und -unterabschnitte (Buchstaben) wurden mit geringfügigen Änderungen aus der Karte von Hughes (23) übernommen. Am Episkop wurden von jedem Unterabschnitt die Länge und die Breite gemessen und aus den Werten von durchschnittlich 5-6 Kernen die entsprechenden Mittel errechnet. In das auf diese Weise erhaltene Umrißschema (Fig.5a) wurde das Querscheibenmuster eingezeichnet (Fig.5b). Zum Vergleich ist in Fig.5c eine Photographie der gleichen Chromosomenabschnitte wiedergegeben. Die vollständige Karte der Speicheldrüsenchromosomen von *D.virilis* ist in Tafel 1 dargestellt.

III Schnürungsexperimente

Vor dem Schnüren wurden die Larven 10 min in H_2O dest. gewaschen. Nach kurzem Abtrocknen auf Kleenex-Papier wurde jede Larve mit einem DAMYL-Kunststoffaden von 0,1 mm Durchmesser geschnürt. Es wurde immer versucht, die Ligatur im Bereich der Körpersegmente 5-6 zu plazieren. Das Schnüren der Larven wurde von 15 min vor bis 15 min nach einem vorgegebenen Zeitpunkt durchgeführt. Die Registrierung des Ergebnisses einer Serie erfolgte 30-40 Stunden

Tafel 1

Karte der Riesenchromosomen in den larvalen
Speicheldrüsen von *Drosophila virilis* 1-2 Stunden
nach dem Verlassen des Futters.



nach dem Schnüren. Bis dahin befanden sich die Larven in einer Petrischale auf feuchtem Kleenexpapier im Thermostaten.

IV Sekretausschüttung

Zu einem vorgegebenen Zeitpunkt wurden alle Larven einer Stichprobe in einem 1ml-Zentrifugenröhrchen vereinigt, in einem Gemisch von CO₂-Schnee und Methanol eingefroren und anschließend einzeln präpariert. Die Speicheldrüsen jeder Larve wurden in einer 7,2 %-igen Saccharoselösung freipräpariert und anschließend 45 min in einem Gemisch von Pikrinsäure, Formol und Eisessig im Verhältnis 15:5:1 (24) fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Drüsen in 70 %-igem Isopropanol für zwölf Stunden aufbewahrt. Aus dem Alkohol wurden die Drüsen für 5 min in 45 %-ige Essigsäure überführt und nach erfolgter Quellung 10 sec in 45 %-iger Karminessigsäure gefärbt. Anschließend wurden die gefärbten Drüsen in eine mit 45 %-iger Essigsäure gefüllte Kammer übertragen, die auf einem Objektträger montiert war und mit einem Deckglas verschlossen werden konnte. Auf diese Weise wurde eine Deformation der Drüsen verhindert. Das Zeichnen der Drüsen erfolgte unter dem Mikroskop mit Hilfe eines Zeiss-Zeichenapparats bei 80-facher Vergrößerung. Von jeder Drüse wurden nur die Umrißlinie und die Begrenzung des Drüsenlumens dargestellt. Die Auswertung der Zeichnungen ist in Fig.6 schematisch dargestellt.

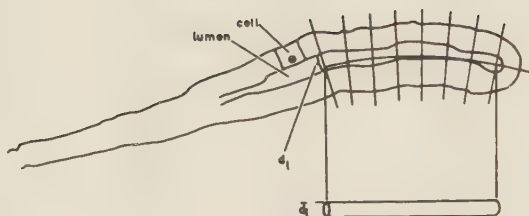


Fig. 6

Die Bestimmung des Volumens des Drüsenlumens im distalen Abschnitt der Speicheldrüse.

Senkrecht zur Längsachse der gezeichneten Drüse wurden, ausgehend vom distalen Ende der Drüse, in 1cm-Abständen acht Geraden gelegt. Aus den acht Werten für den Lumendurchmesser d_1 wurde der mittlere Lumendurchmesser $\bar{d}_1$ errechnet. Der von den Geraden eingeschlossene Bereich des Lumens wurde idealisierend als Kreiszylinder betrachtet und dessen Volumen berechnet.

V Injektionsexperimente

Für die Dosierung der zu injizierenden Flüssigkeitsmenge wurde eine 10 μ l-HAMILTON-Mikroliterspritze mit Dosiervorrichtung verwendet. Der am Kanülenende austretende Flüssigkeitstropfen von 0,2 μ l Volumen, wurde in die Injektionskanüle, die über einen mit Paraffinöl gefüllten PVC-Schlauch mit einem Vortrieb verbunden war, eingesaugt. Die Injektion erfolgte durch den After in die Hämolymphe der Larve. Die für die Injektion verwendeten Glaskanülen besaßen an der Spitze einen Durchmesser von 30 μ und waren schräg abgebrochen. Nach der Injektion wurde jede Larve in einem 1ml-Zentrifugenröhrchen, dessen Öffnung mit einem feuchten Wattebausch verschlossen war, bis zum Zeitpunkt der Präparation der Speicheldrüsen in Thermostaten bei 25,3°C aufbewahrt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Speicheldrüsen nach der im Kapitel "Präparation und Färbung der Chromosomen" beschriebenen Weise behandelt.

Es wurden folgende Lösungen injiziert:

1) Metabolite des Glucosaminstoffwechsels

Glucosamin (GM), 10^{-2} M in $4 \cdot 10^{-3}$ M HCl, pH 7,0;

N-acetylglucosamin (NACGM), 10^{-2} M in $5,4 \cdot 10^{-5}$ M Tris,
pH 6,8;

ein Gemisch von Fructose-6-phosphat, 10^{-2} M und
Glutamin, 10^{-2} M

(F-6-P/Glu-NH₂), in H₂O, pH 6,6;

2) Azaserin, 10^{-2} M in $2,5 \cdot 10^{-4}$ M Tris, pH 6,8.

3) Ecdyson, 0,1 μ g gelöst in 0,2 μ l H₂O.

4) Kontrollsubstanzen:

Tris/HCl-Puffer, $5 \cdot 10^{-3} \text{M}$, pH 6,9;

Ribose, 10^{-2}M in H_2O , pH 6,8;

H_2O dest.

Die Substanzen stammten von folgenden Firmen:

GM von Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland, Ohio;

NAcGM von Schuchardt, München; F-6-P von Boehringer,

Mannheim; $\text{Glu} \cdot \text{NH}_2$ und Ribose von Serva, Heidelberg;

Azaserin von Calbiochem, Luzern. Ecdyson war ein Geschenk von Dr.P.Hocks, Schering AG, Berlin.

C 7) ERGEBNISSE

I. Normalentwicklung

1) Der Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung

Verschiedene Hinweise sprechen dafür, daß die Reaktion des Genoms auf gleichartige experimentelle Eingriffe bei Larven verschiedenen Alters unterschiedlich sein kann (25,35). Die Fähigkeit zu normaler Weiterentwicklung war dabei umso größer, je älter die Larven waren. Es schien daher günstig, die vorgesehenen Injektionsexperimente im Zeitraum zwischen dem Hochkriechen und der Pupariumbildung durchzuführen.

Bei der Wahl des genauen Zeitpunkts mußte des weiteren berücksichtigt werden, daß bei *Drosophila* im Verlauf dieses Entwicklungsabschnitts zahlreiche Veränderungen des Puffmusters zu beobachten sind (14,25,26); dieser Zeitraum wurde daher von Becker als "puffing-Period"

bezeichnet (25). Die Veränderungen genetischer Aktivität in der puffing-Periode stehen mit der Ecdysonausschüttung in Zusammenhang (27). Sie konnten in unterschiedlichem Grade durch Injektion von Ecdyson in Larven verschiedener Drosophilaarten induziert werden (28,29). Es war daher nötig, die Injektionsexperimente in einem Zeitraum vorzunehmen, in dem Veränderungen des Puffmusters als Folge der Ecdysonausschüttung nicht zu erwarten waren, d.h. in dem Zeitraum zwischen dem Hochkriechen und dem Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung. Die Bestimmung dieses Zeitpunkts war mit Hilfe von Schnürungsexperimenten relativ einfach durchzuführen. Die theoretischen Grundlagen dieser Methode sind bei Becker (27) ausführlich beschrieben.

Es wurden zwei voneinander unabhängige Serien von Larven geschnürt, die sich hinsichtlich ihrer Aufzuchtbedingungen etwas voneinander unterschieden. In der Serie A wurden sowohl männliche als auch weibliche Larven im Zeitraum von 2-10h n.d.H. geschnürt. Da sich jedoch in den späteren Untersuchungen zeigte, daß bei männlichen Larven nach dem Hochkriechen die Pupariumbildung zwei Stunden später eintrat als bei weiblichen Larven, wurden in der zweiten Schnürungsserie (Serie B) die Larven nach Geschlechtern getrennt. Da außerdem von der Serie A her der Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung ungefähr bekannt war, wurden in der Serie B die Schnürungen nur noch im Zeitraum von 5-8h n.d.H. durchgeführt. Das Ergebnis der Serie B ist in Tab.1 und Fig.7 dargestellt.

Tab. 1

Ergebnis der Schnürungsserie B (nur weibliche Larven).

Es wurden drei Gruppen von Larven registriert:

vo-Larven: Larven, die nur vor der Ligatur sklerotisiert waren;

ga-Larven: Larven, die ganz, also vor und hinter der Ligatur sklerotisiert waren;

T-Larven : Larven, die nicht gewertet werden konnten, da sie entweder

a) nach dem Schnüren in mindestens einer der beiden Hälften schwarz geworden waren;

b) nur hinter der Ligatur sklerotisiert waren;

c) weder vor noch hinter der Ligatur sklerotisiert waren.

Zeitpunkt der Schnürung (Stunden n.d.H.)	5	6	7	8	Summe
vo	11	18	7	3	
ga	6	16	23	9	
T	40	41	33	15	
vo + ga = z	17	34	30	12	93 = z
vo+ga+ T= n	57	75	63	27	222 = N

vo	11	18	7	3	
ga	6	16	23	9	
T	40	41	33	15	
vo + ga = z	17	34	30	12	93 = z
vo+ga+ T= n	57	75	63	27	222 = N

Fig. 7

Ergebnis der Schnürungsserie B (nur weibliche Larven).
Die verwendeten Symbole entsprechen denjenigen der Tab. 1.

a) Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung und der Pupariumbildung.

Ordinate: prozentualer Anteil;

Abszisse: Stunden nach dem Hochkriechen.

I) ga-Larven/z · 100 %; (Z = 93). Der experimentell ermittelte Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung (E_{exp}) liegt bei 6,1h n.d.H.

II) WS-Larven/n · 100 %; (N = 222). Der korrigierte Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung (E_{korr}) liegt bei 6,6h n.d.H. (Erklärung von WS siehe Text S.17).

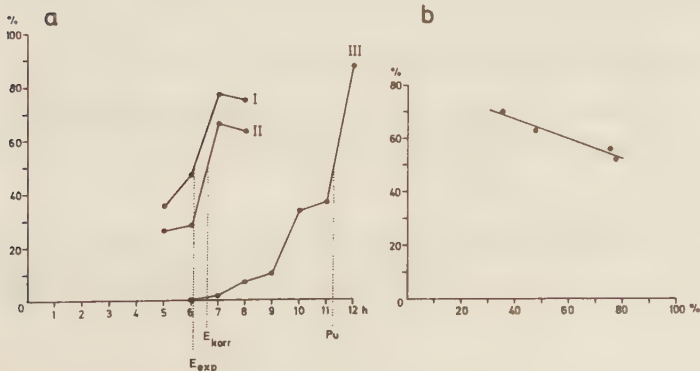
III) Anteil gebildeter Puparien in der Normalentwicklung bei insgesamt 337 registrierten Larven. Der Zeitpunkt der Pupariumbildung (= Pu) liegt bei 11,2h n.d.H. Die Werte dieser Kurve waren bei anderen Untersuchungen gewonnen worden, die unter Bedingungen durchgeführt wurden, die der Serie B entsprachen. Die Übernahme dieser Werte in das Diagramm ist daher gerechtfertigt.

b) Korrelation zwischen dem Anteil von ga-Larven und dem Anteil von T-Larven.

Ordinate: T-Larven/n · 100 %;

Abszisse: ga-Larven/z · 100 %.

$r = -0,97$; $b = -0,37$.



Dem Experiment zufolge sind 6,1h n.d.H. 50% der auswertbaren Larven auch hinter der Ligatur sklerotisiert (Fig. 7a,I). Somit hat zu diesem Zeitpunkt ($=E_{exp}$) der Ecdyson-titer der Hämolymphe einen Wert erreicht, der die Skle-rotisierung auch ohne weitere Ecdysonzufuhr von der Ring-drüse her gewährleistet.

Wie aus Fig.7b zu ersehen ist, besteht eine negative Korrelation zwischen der Häufigkeit von ga-Larven und der Häufigkeit von T-Larven. Diese Korrelation war auch in der Serie A zu beobachten. Sowohl die Korrelationskoeffizienten r als auch die Regressionskoeffizienten b beider Serien stimmen gut überein (Tab.2). Diese Korrela-tion läßt darauf schließen, daß ga-Larven zu einem ge-ringeren Prozentsatz nach dem Schnüren absterben als vo-Larven. Dementsprechend wird innerhalb der einzelnen Stichproben der relative Anteil der ga-Larven größer und der durch das Experiment ermittelte Zeitpunkt der Ecdy-sonausschüttung ($=E_{exp}$) gegenüber dem wahren Zeitpunkt auf der Zeitskala nach links verschoben. Um die Größe der zeitlichen Verschiebung abzuschätzen, wurde von der Voraussetzung ausgegangen, daß jede Stichprobe zum Zeit-punkt der Schnürung aus zwei Populationen besteht:

- 1) aus sensiblen ($=S$) Larven, von denen ein Teil mit der relativen Häufigkeit x nach dem Schnüren abstirbt ($=T$ -Larven) während die Überlebenden als vo-Larven registriert werden;
- 2) aus weniger sensiblen ($=WS$) Larven, von denen ein Teil mit der relativen Häufigkeit y (wobei $y < x$) nach

Tab. 2

Vergleich der Ergebnisse der Schnürungsserie A (weibliche und männliche Larven) und der Serie B (nur weibliche Larven). Zur Erklärung der verwendeten Symbole siehe Tab. 1 und Text.

	Serie A	Serie B
N	787	222
Schnürungszeitpunkte ^{a), b)}	2 - 10	5 - 8
E_{exp} ^{b)}	5,4	6,1
Zeitpunkt der Puparium- bildung (= Pu) ^{b)}	~10,2	11,2 ^{c)}
Korrelationskoeffizient r	-0,89 ($r \neq 0$) ^{d)}	-0,97 ($r \neq 0$)
Regressionskoeffizient b	-0,35 ($b \neq 0$)	-0,37 ($b \neq 0$)
x ^{d)}	0,60 $\pm$ 0,04	0,72 $\pm$ 0,19
y ^{d)}	0,24 $\pm$ 0,07	0,49 $\pm$ 0,33
E_{korr} ^{b)}	5,8	6,6
$E_{exp} - E_{korr}$ (h)	-0,4	-0,5
Pu - E_{korr} (h)	4,4	4,6

^{a)} Es wurde in Abständen von jeweils einer Stunde geschnürt (siehe Mat. und Meth.)

^{b)} In Stunden n.d.H.

^{c)} siehe Fig. 7a, Kurve III.

^{d)} r und b wurden auf Verschiedenheit von Null geprüft. Alle Signifikanzgrenzen dieser Tabelle wurden nach dem t-Test für $p = 0,05$ bestimmt (30).

dem Schnüren abstirbt (=T-Larven), während die Überlebenden als ga-Larven registriert werden.

In dem Zeitraum, in dem die Schnürungen durchgeführt wurden, nimmt im Laufe der Entwicklung der Anteil von S-Larven immer mehr ab, während derjenige der WS-Larven größer wird. Auf diese Weise ist die Abnahme der Sterberate mit zunehmendem Alter der geschnürten Larven zu erklären. Die unter 1) und 2) festgelegten Beziehungen lassen sich durch folgende vier Gleichungen ausdrücken:

- a) $S + WS = n;$
- b) $S - Sx = vo;$
- c) $WS - WSy = ga;$
- d) $Sx + WSy = T.$

Aus diesen Gleichungen können x und y abgeleitet werden:

$$x = \frac{n_i T_j - n_j T_i + vo_j T_i - vo_i T_j}{n_i vo_j - n_j vo_i + n_i T_j - n_j T_i} \quad \text{und}$$

$$y = \frac{n_i T_j - n_j T_i + ga_j T_i - ga_i T_j}{n_i ga_j - n_j ga_i + n_i T_j - n_j T_i}.$$

Dabei bedeuten Index i: Wert aus einer Stichprobe, deren Larven zum Zeitpunkt t_i geschnürt wurden;

Index j: Wert aus einer Stichprobe, deren Larven zum Zeitpunkt t_j geschnürt wurden.

Für die Indizes gilt die Beziehung $i < j$.

Aus allen möglichen Paaren t_i, t_j wurden die Werte für x und y errechnet und die erhaltenen Werte jeweils gemittelt.

Unter den Werten x und y traten auch solche auf, die <0 oder >1 waren. In der Serie A waren dies acht von insgesamt 63, in der Serie B zwei von insgesamt 12 Werten. Diese biologisch sinnlosen Werte wurden bei der Berechnung des Mittels von x und y nicht berücksichtigt. Über ihr Zustandekommen kann keine exakte Auskunft gegeben werden. Da aber für die Berechnung von x und y jeweils 3 Variable aus zwei verschiedenen Stichproben nötig waren, und die empirischen Werte dieser Variablen einer statistischen Streuung unterliegen, besteht die Möglichkeit, daß bei bestimmten Kombinationen von Meßdaten solche Extremwerte auftreten.

In Tab. 2 sind die Endresultate beider Serien wiedergegeben. Während sich x und y in der Serie A signifikant voneinander unterscheiden, ist dies in der Serie B nicht der Fall. Dies ist in erster Linie auf die sehr großen Vertrauensbereiche zurückzuführen. Für die großen Streubreiten in der Serie B ist wahrscheinlich die geringe Anzahl von geschnürten Larven in den einzelnen Stichproben verantwortlich zu machen, da sich z.B. bei Berücksichtigung der männlichen Larven die Vertrauensbereiche für $p = 0,05$ verringern: $x = 0,77 \pm 0,10$ und $y = 0,54 \pm 0,16$, bei einem vergrößerten Stichprobenumfang von nunmehr $N' = 381$. Außerdem wurde in der Serie A zu 9 verschiedenen Zeitpunkten geschnürt, in der Serie B nur zu vier verschiedenen Zeitpunkten. Diese geringe Anzahl vergrößert die Vertrauensbereiche ebenfalls.

Obwohl sich die Werte x und y in der Serie B nicht signifikant voneinander unterscheiden, werden diese als real betrachtet, da die für die Korrelation zwischen der Häufigkeit von ga-Larven und der Häufigkeit von T-Larven charakteristischen Größen r und b in beiden Serien jeweils gut übereinstimmen (vgl. Tab. 2) und deshalb die Ver-

schiedenheit von x und y, die in der Serie A statistisch gesichert nachgewiesen werden konnte, auch in der Serie B vorhanden sein muß.

Experimentelle Hinweise für die Gültigkeit der hier abgeleiteten Größen x und y konnten aus der Serie A gewonnen werden. Bei den 2h und 3h n.d.H geschnürten Larven (n= 183) wurden T-Larven mit einer relativen Häufigkeit von 0,64 registriert. Von den Überlebenden waren 94 % vo-Larven; die Population geschnürter Larven bestand somit beinahe ausschließlich aus S-Larven. Bei den zum Zeitpunkt 10h n.d.H. geschnürten Larven (n= 57) wurden T-Larven mit einer relativen Häufigkeit von 0,33 registriert. Da von den Überlebenden 87 % ga-Larven waren, bestand die Population geschnürter Larven zum größten Teil aus WS-Larven. Wären nur WS-Larven vorhanden gewesen, wäre die relative Häufigkeit von T-Larven $< 0,33$ gewesen. Die beiden experimentell ermittelten Häufigkeiten von T-Larven stimmen recht gut mit den für die Serie A errechneten Werten $x = 0,60$ und $y = 0,24$ überein.

Durch Umwandlung der Gleichungen a-c (S.19) läßt sich die Beziehung

$$WS = \frac{\frac{ga}{1-y} + n - \frac{vo}{1-x}}{2}$$

ableiten. Aus ihr konnte mit Hilfe der Werte für x und y in jeder Stichprobe die Anzahl der WS-Larven bestimmt werden und deren relative Häufigkeit WS/n . Es ergab sich auf diese Weise eine Kurve, die gegenüber der experimentell ermittelten Kurve auf der Zeitskala nach rechts verschoben

ist und die den korrigierten Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung ($= E_{\text{korr}}$) lieferte (Fig.7a, II).

Die Größe der zeitlichen Verschiebung $E_{\text{exp}} - E_{\text{korr}}$ war in beiden Serien annähernd gleich (Tab.2). Die durch die unterschiedliche Sensibilität der beiden Larventypen hervorgerufene Verschiebung des Zeitpunkts E_{exp} gegenüber dem wahren Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung dürfte demnach auf $\sim 1/2$ Stunde angesetzt werden. Diese Größenordnung erscheint relativ sicher, wenn man berücksichtigt, daß in beiden Serien insgesamt 1009 Larven geschnürt wurden.

In späteren Untersuchungen wurde festgestellt, daß nach dem Hochkriechen weibliche Larven zwei Stunden früher das Puparium bilden als männliche. Läßt man diesen Befund auch für die Serie A gelten, so müßten die weiblichen Larven das Puparium eine Stunde vor dem experimentell ermittelten Zeitpunkt bilden, da dieser eine gemischtgeschlechtliche Population repräsentiert. Bei den weiblichen Larven der Serie A wäre demnach die Pupariumbildung $\sim 9,2\text{h n.d.H.}$ eingetreten, d.h. zwei Stunden früher als bei den weiblichen Larven der Serie B, die das Puparium erst $11,2\text{h n.d.H.}$ bildeten. Demgegenüber war in beiden Serien der Zeitraum zwischen Ecdysonausschüttung und Pupariumbildung annähernd gleich (Tab.2, $Pu - E_{\text{korr}}$). Die verschiedenen Aufzuchtbedingungen in beiden Serien beeinflussten jedenfalls nicht den zeitlichen Abstand zwischen Ecdysonausschüttung und Pupariumbildung. Ob der Unterschied zwischen beiden Serien auf die zeitliche Verschiebung entweder des Hochkriechens oder der Ecdysonaus-

schüttung zurückzuführen ist, kann nicht entschieden werden.

Da alle weiteren Untersuchungen (zeitliche Festlegung der Sekretausschüttung, Analyse des Puffmusters, Injektionsexperimente) unter Bedingungen durchgeführt wurden, die denjenigen der Serie B entsprechen (es ist hier vor allem die gleiche Aufzuchttemperatur von $25,3^{\circ}\text{C}$ zu nennen), wird im weiteren nur auf den Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung dieser Serie Bezug genommen. Die Daten der Serie A wurden angeführt, weil die prinzipielle Übereinstimmung der Ergebnisse beider Serien den etwas unsicher erscheinenden Werten der Serie B einen überzeugenderen Charakter verleihen.

2) Der zeitliche Ablauf der Sekretausschüttung

Bei Chironomus konnte die Aktivität bestimmter Puffs in den Chromosomen der larvalen Speicheldrüsen mit der Synthese bestimmter Sekretproteine korreliert werden (31, 32). Auch bei Drosophila wurde auf eine mögliche Korrelation zwischen der Aktivität eines bestimmten Puffs und dem Auftreten von "Vakuolen" (33) oder "G-Granulen" (14) in den Zellen der Speicheldrüsen hingewiesen. Unter diesem Gesichtspunkt war die Annahme gerechtfertigt, daß Änderungen in der Syntheseleistung der Zellen von Änderungen des Puffmusters begleitet sein könnten. Weiterhin durfte angenommen werden, daß die Synthese des Sekrets entweder vor oder in dem Zeitraum beendet wird, in dem es aus den Drüsenzellen in das Lumen übertritt. Aus die-

sen Gründen schien es interessant, nach einem zeitlichen Zusammenhang zwischen der Extrusion des Sekrets und den Veränderungen des Puffmusters zu suchen.

Der zeitliche Ablauf der Extrusion wurde anhand der Volumenzunahme des Drüsenlumens bestimmt. Im Zeitraum von 6-12 Stunden n.d.H. wurden im Abstand von jeweils 1 Stunde Larven präpariert und deren Drüsen gezeichnet (siehe Material und Methoden). Insgesamt wurden von 98 Larven die Drüsen gezeichnet. Konnten von einer Larve beide Drüsen gezeichnet werden, so wurden die aus den Zeichnungen gewonnenen Werte gemittelt (die Lumina von Drüsenpaaren differierten nur geringfügig). Der untersuchte Abschnitt jeder Drüse (siehe Material und Methoden) entsprach dem Drüsenteil, in dem auch die Chromosomen hinsichtlich ihres Puffmusters analysiert wurden.

60 Larven hatten zum Zeitpunkt der Entnahme der Stichproben bereits das Puparium gebildet. In ihnen konnte das Volumen des Speicheldrüsenlumens nicht gemessen werden, da das vor der Pupariumbildung synthetisierte und in das Lumen abgegebene Sekret wenige Minuten nach der Pupariumbildung aus der Drüse ausgestoßen wird. Da jedoch für die zeitliche Festlegung der vor der Pupariumbildung stattfindenden Sekretextrusion alle Individuen jeder Stichprobe berücksichtigt werden mußten, wurden die bereits verpuppten Larven der höchsten Volumenklasse ($V \geq 60 \cdot 10^{-6} \mu^3$) zugeschlagen, da diese Klasse den Endzustand der Extrusion repräsentiert.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Fig.8 dargestellt. Wie aus Fig.8b zu ersehen ist, beginnt das Volumen des Drüsenlumens sich ab ungefähr 8h n.d.H. zu vergrößern. Der größte Teil des Sekrets wird innerhalb von 30-40 min in das Lumen sezerniert, danach geben die Zellen nur noch in einer geringfügigen Rate Sekret ab. 10h n.d.H.

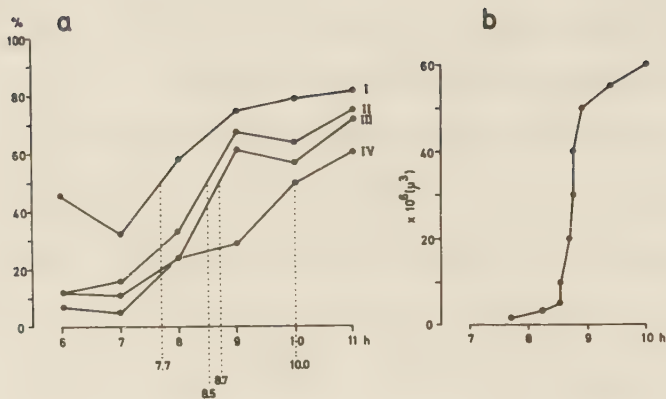


Fig. 8

Der zeitliche Ablauf der Sekretausschüttung.

a) Ordinate: prozentualer Anteil;

Abszisse: Stunden n.d.H.

Zu den auf der Abszisse angegebenen Zeitpunkten wurden Stichproben entnommen. In jeder Stichprobe wurde der prozentuale Anteil der Drüsenlumina bestimmt, die ein gegebenes Volumen V erreicht oder überschritten hatten. Für jede Kurve der sich ergebenden Kurvenschar wurde der Zeitpunkt ermittelt, zu dem 50 % der Drüsenlumina das gegebene Volumen V erreicht oder überschritten hatten.

I : $V \geq 2,0 \cdot 10^6$; II : $V \geq 10,0 \cdot 10^6$;

III : $V \geq 30,0 \cdot 10^6$; IV : $V \geq 60,0 \cdot 10^6 (\mu^3)$.

b) Zeitpunkte, zu denen 50 % der Drüsenlumina ein gegebenes Volumen V (Ordinate) erreicht oder überschritten hatten.

Abszisse: Stunden n.d.H.

besitzt der untersuchte Abschnitt des Drüsenlumens ein durchschnittliches Volumen von $60 \cdot 10^6 \mu^3$. Wahrscheinlich nimmt bis zur Pupariumbildung das Volumen noch weiter zu, da es in den Drüsen von drei Larven auf Werte über $65 \cdot 10^6 \mu^3$ angestiegen war.

3) Das Puffmuster und seine Veränderungen

Die Kenntnis des normalen Puffmusters und seiner Veränderungen war eine Grundvoraussetzung für die Beurteilung der in den Injektionsexperimenten beobachteten Veränderungen. Gleichzeitig sollte die Frage untersucht werden, wieweit in der Normalentwicklung die Veränderungen des Puffmusters sowohl mit der Ecdysonausschüttung als auch mit der Sekretausschüttung korreliert sind.

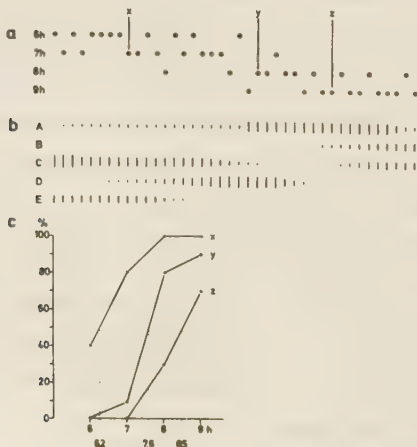
Für die Erstellung des gesamten Puffmusters standen Quetschpräparate von 29 Speicheldrüsenpaaren zur Verfügung. Die Stichproben wurden im Zeitraum von 1-10h n.d.H. gemacht, wobei die Präparation der Drüsen von 15 min vor bis 15 min nach einem vorgegebenen Zeitpunkt durchgeführt wurde. Für die zeitliche Festlegung der Puffmusteränderungen wurden 93 weitere Präparate verwertet, in denen die Analyse der Chromosomen auf bestimmte Loci beschränkt geblieben war, deren Aktivitätszustand als Markierung für verschiedene Phasen der puffing-Periode diente. Die Verfahrensweise zur zeitlichen Festlegung dieser Veränderungen ist in Fig.9 schematisch dargestellt. Das vollständige Puffmuster und seine Veränderungen im Laufe der ersten 10 Stunden nach dem Hochkriechen ist in den Tafeln 2-6,a wiedergegeben.

Fig. 9

Schematische Darstellung der zeitlichen Festlegung der Puffmusteränderungen.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Hochkriechen wurden n Speicheldrüsenpräparate angefertigt. Jedes Präparat wird durch einen schwarzen Punkt repräsentiert (a). Entsprechend der Aktivität bestimmter Puffs (b, A-E; die verschiedenen Aktivitätsgrade der Puffs werden durch verschiedene Länge der Striche symbolisiert) wurden die Präparate ohne Rücksicht auf den Zeitpunkt der Präparation so angeordnet, daß sich ein zusammenhängendes Bild der Puffmusteränderungen ergab (b). Jeder Punkt in (a) repräsentiert somit ein bestimmtes Puffmusterstadium.

Die zeitliche Festlegung der Veränderungen erfolgte in der Weise, daß für ein bestimmtes Präparat (z.B. x, y oder z in a) festgestellt wurde, wie oft (in Prozenten) das diesem Präparat entsprechende Entwicklungsstadium in jeder der Stichproben vom Umfang n erreicht oder überschritten worden war. Der Schnittpunkt der sich für jedes Präparat ergebenden Kurve mit dem 50 %-Niveau (c) ergab den Zeitpunkt, für den in der Normalentwicklung das dem jeweiligen Präparat entsprechende Puffmuster charakteristisch ist.



Tafeln 2-6

Das Puffmuster von *D. virilis* und seine Veränderungen in den ersten 10 Stunden nach dem Hochkriechen.

Diagramm auf der linken Seite:

Ordinate: Stunden nach dem Hochkriechen;

Abszisse: Volumenzunahme des Drüsenlumens in $\mu^3/15 \text{ min.}$

E = Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung.

In den Chromosomen sind inaktive Banden durch ausgezogene Striche dargestellt, aktive Banden sind je nach dem Grad ihrer Auflockerung mehr oder weniger dicht punktiert. Außerdem ist ihr Auflockerungsbereich rot ausgefüllt, damit ein dem zytologischen angenähertes Bild entsteht (vgl. Abb. 1). Jede Linie zwischen den Chromosomen symbolisiert die Aktivität derjenigen Banden, die beim Verlängern der Linie von ihr berührt wird. Zunehmende Dicke der Linien bedeutet zunehmende Puffaktivität.

- a) Jeder Strich kennzeichnet eine Bande, an der in dem beobachteten Zeitraum eine oder zwei Änderungen auftraten. Der Zeitpunkt jeder Änderung ist jeweils von der Zeitskala auf der linken Seite abzulesen.
- b) Jeder Strich kennzeichnet eine Bande, an der im Typ-II_p-Puffmuster eine der Normalentwicklung entsprechende Veränderung auftrat (vgl. S.46). Schwache Reaktion ist durch eine gestrichelte Linie dargestellt. An den Loci der Gruppen 3 und 4 (Tab. 3) wurde im allgemeinen nur die erste Veränderung beobachtet, jedoch nicht die zweite. Die beiden Ausnahmen sind durch ein (+) markiert.
- c) Jeder Strich kennzeichnet eine Bande, an der nach Injektion von 0,1 μg Ecdyson eine normale Reaktion beobachtet wurde. Die obere Hälfte der Striche symbolisiert die Einwirkungsdauer von 0,5h, die untere Hälfte diejenige von 1h. Bei den Loci der Gruppen 3 und 4 konnte aus dem Aktivitätszustand nicht geschlossen werden, ob nur die erste Veränderung induziert worden war oder auch die zweite.

Die Markierungen in b) und c) ermöglichen es festzustellen, wie die Banden, die im Typ-II_p-Puffmuster

eine normale Veränderung zeigten, auf Ecdysoninjektion reagierten und umgekehrt.

Zum besseren Verständnis der Tafeln sind die verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten in der folgenden Hilfstabelle dargestellt:

	A	B	C	D	E	F	G	H	J
Typ-I _b	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Typ-II _b	+	+	-	-	+	+	-	+	+
b					?	?			?
c							?	?	?
Ecdyson	+	-	+	-	-	+	+	+	+
H ₂ O	-	-	-	-	-	-	+	+	+

+: eine der Normalentwicklung entsprechende Veränderung;
-: keine Veränderung.

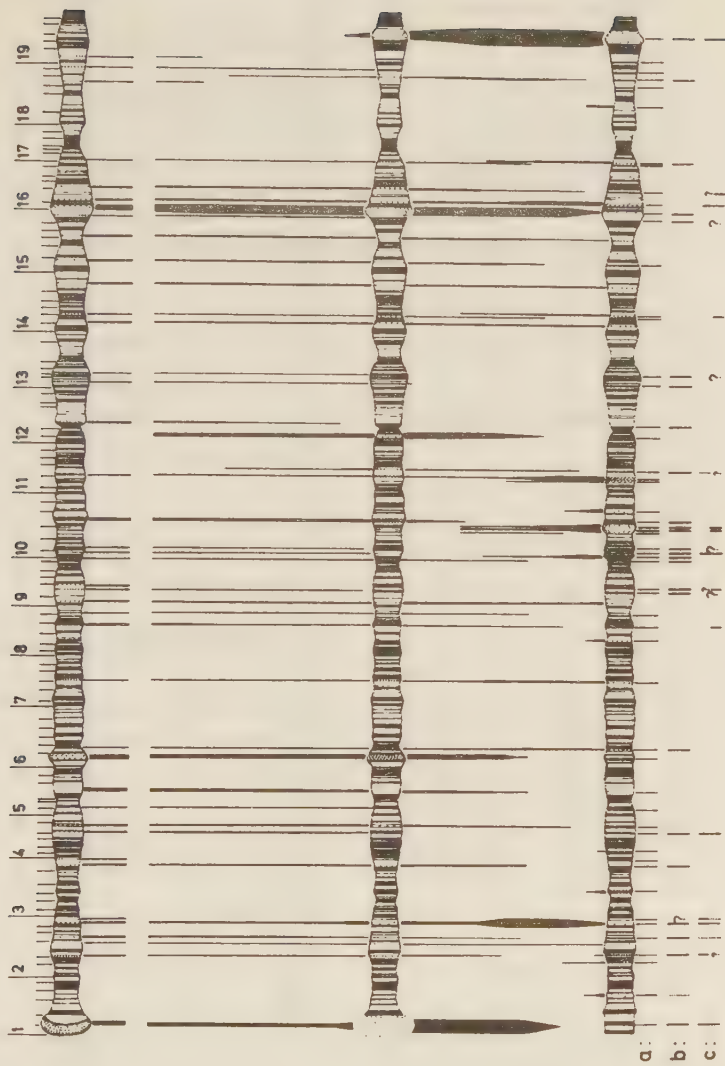
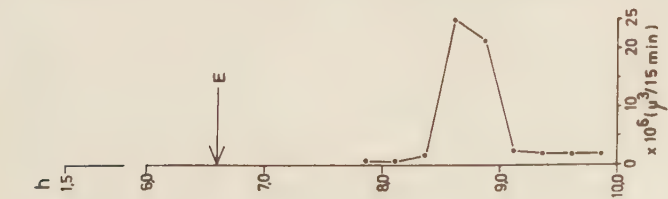
Die Striche in b und c entsprechen denjenigen in den Tafeln 2-6.

Ein Fragezeichen in der Zeile b bedeutet, daß eine Veränderung nicht nur im Typ-II_b-Puffmuster sondern auch im Typ-I_b-Puffmuster auftrat und somit in diesem als Injektionseffekt interpretiert werden muß (vgl. auch Engdruck S.46). Diese Veränderung kann man daher nicht dem Typ-II_b-Puffmuster zurechnen. Das Fragezeichen in der Spalte F bedeutet darüber hinaus, daß eine Spezifität der Ecdysonwirkung in diesen Fällen fraglich ist.

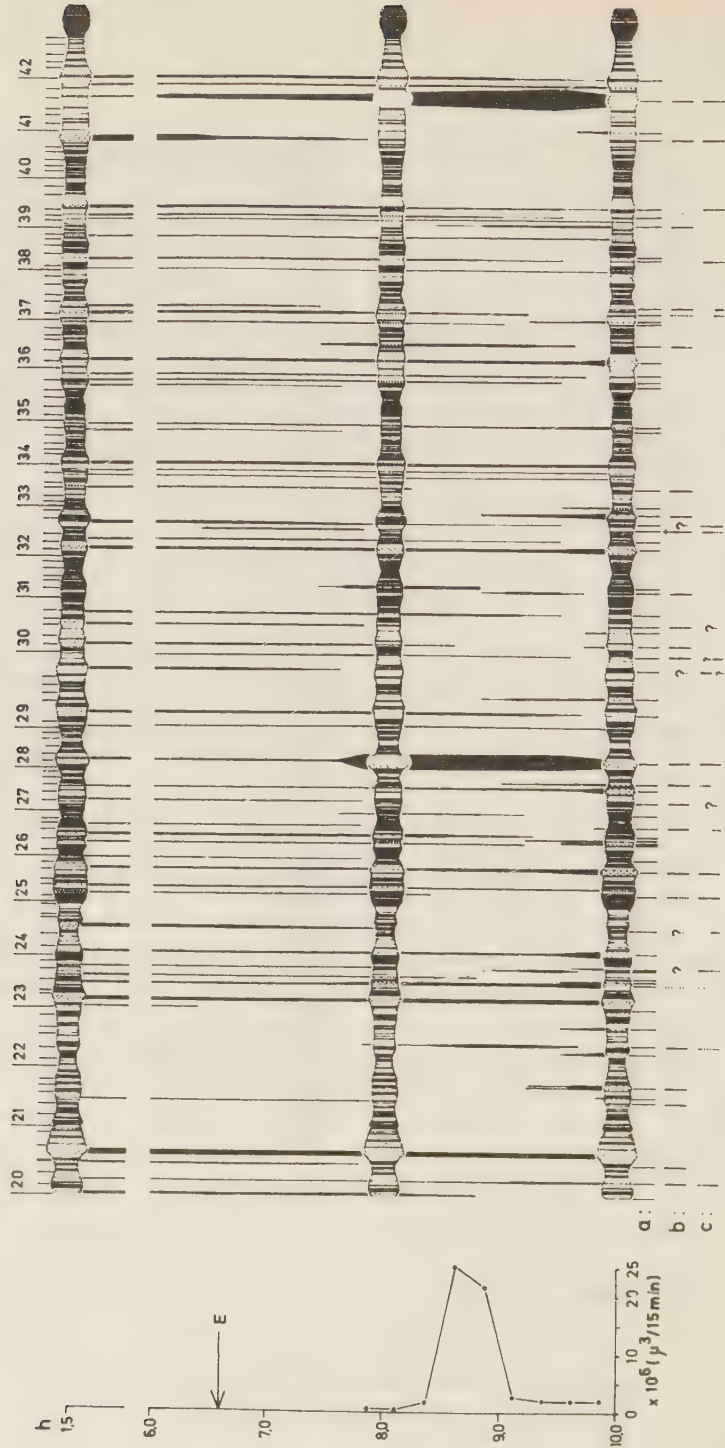
Ein Fragezeichen in der Zeile c bedeutet, daß eine Veränderung sowohl nach Injektion von Ecdyson als auch nach Injektion von H₂O beobachtet wurde. In einem solchen Falle erhält man über die Wirksamkeit des Ecdysons keinen Aufschluß.

In den Tafeln 2-6, b und c sind nur fünf der verschiedenen Möglichkeiten dargestellt (Spalten A, B, C, F und H).

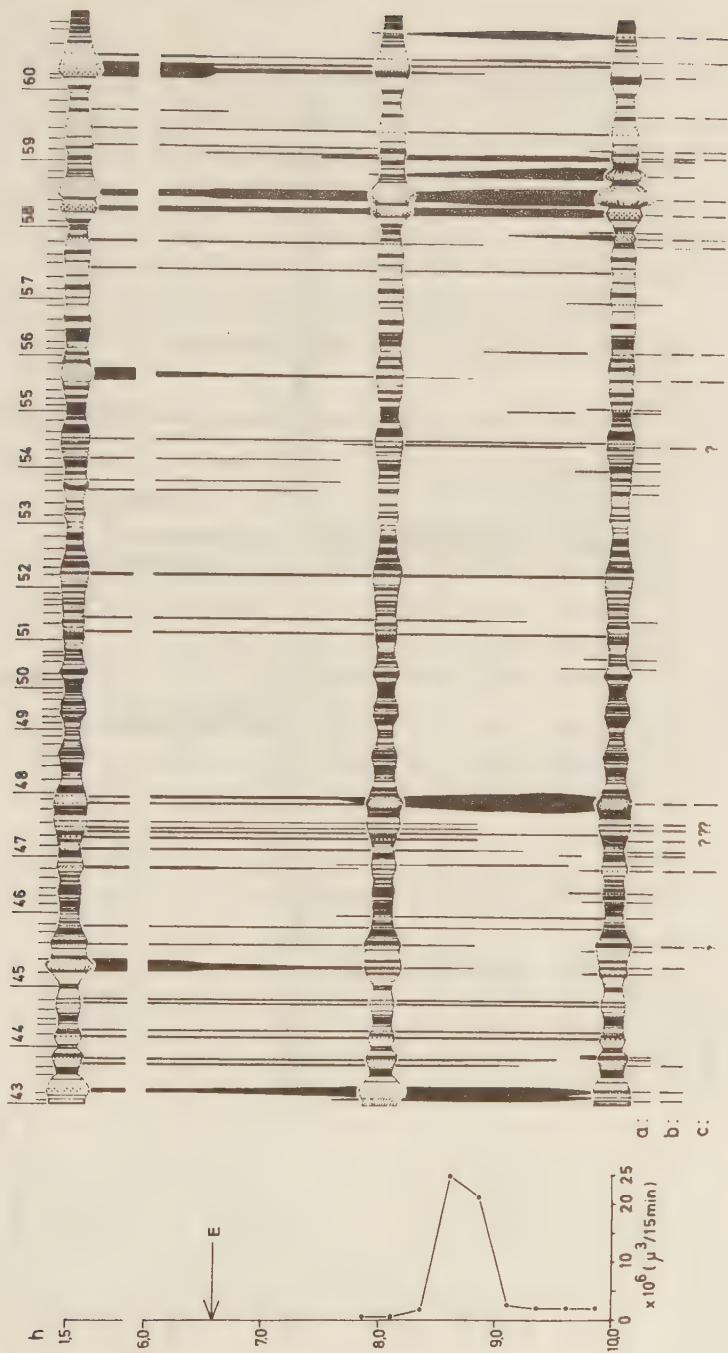
Chrom. I



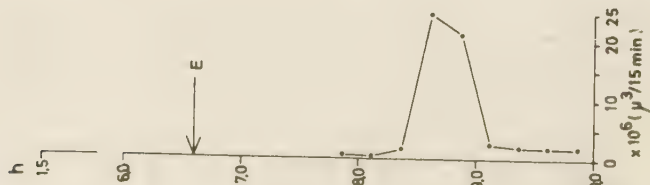
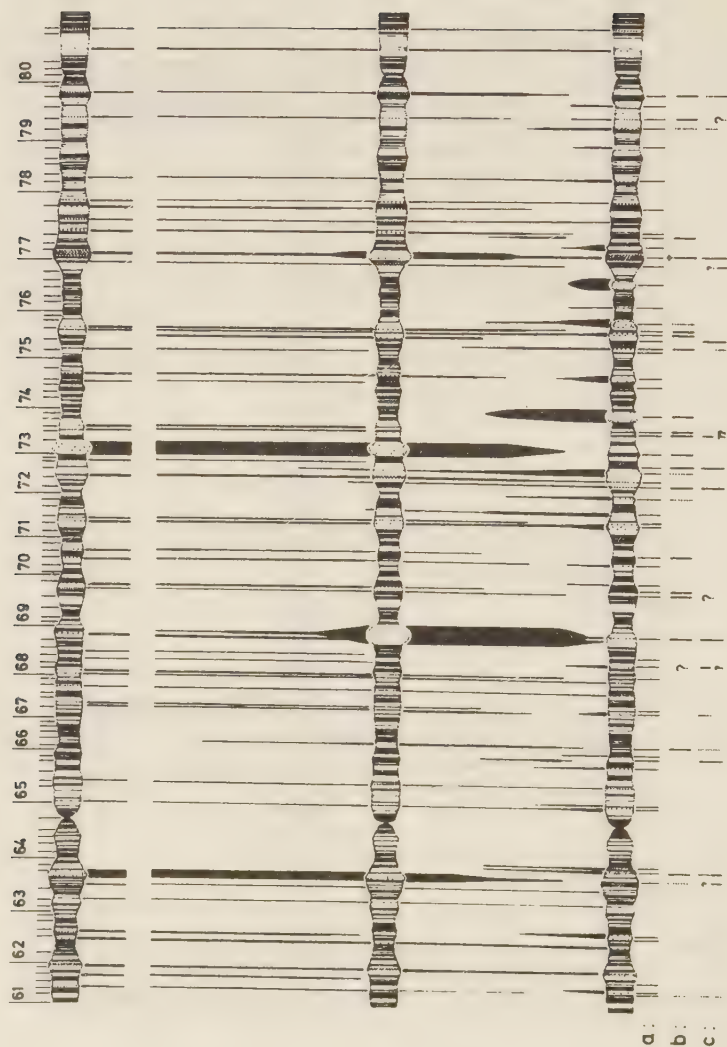
Chrom. II



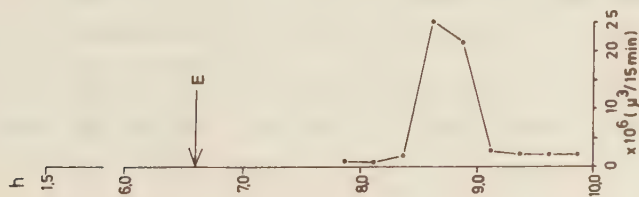
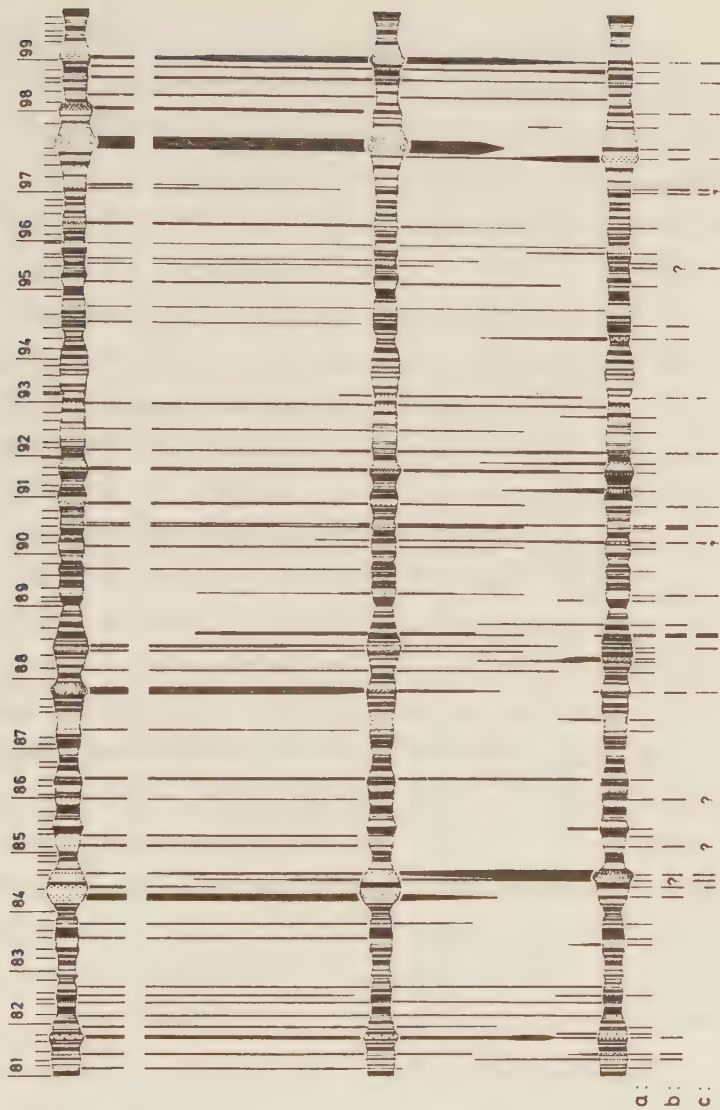
Chrom. III



Chrom. IV



Chrom. V



Insgesamt konnte in diesem Zeitraum an 332 verschiedenen Banden genetische Aktivität festgestellt werden. Dies sind ungefähr 23 % der lichtmikroskopisch erkennbaren Banden. Von den aktiven Banden änderten 286 (= 86 %) im Verlaufe des untersuchten Entwicklungsabschnitts ihre Aktivität.

Unter den ausgewerteten Präparaten befand sich eines, dessen Puffmuster ein stark fortgeschrittenes Stadium der puffing-Periode repräsentierte. Die Larve mußte bei der Präparation kurz vor der Pupariumbildung gestanden haben. Auf der Analyse dieses Präparats basieren die Angaben, die über die Veränderungen des Puffmusters im Zeitraum zwischen 10h n.d.H. und der Pupariumbildung gemacht werden. Berücksichtigt man dieses Präparat, so waren im Zeitraum zwischen 1 und 11,2h n.d.H. 348 Banden aktiv, von denen 319 (= 91 %) ihre Aktivität in diesem Zeitintervall veränderten. Da in diesem Präparat 49 der 600 Chromosomenabschnitte nicht beobachtet werden konnten, besteht die Möglichkeit, daß sich die beiden Werte noch geringfügig erhöhen. Allerdings sind die nicht registrierten Chromosomenbereiche relativ "aktivitätsarm", da z.B. 10h n.d.H. insgesamt nur 7 aktive Banden (= 4 % aller der zu diesem Zeitpunkt aktiven Banden) in ihnen zu beobachten waren.

Die aktiven Banden lassen sich in fünf verschiedene Gruppen ordnen (Tab.3, Spalten A und B). Summiert man innerhalb jeder dieser Gruppen die Aktivitäten der Puffs in aufeinanderfolgenden Zeitintervallen, so ergeben sich charakteristische Aktivitätsmuster (Fig.10). Es zeigt sich,

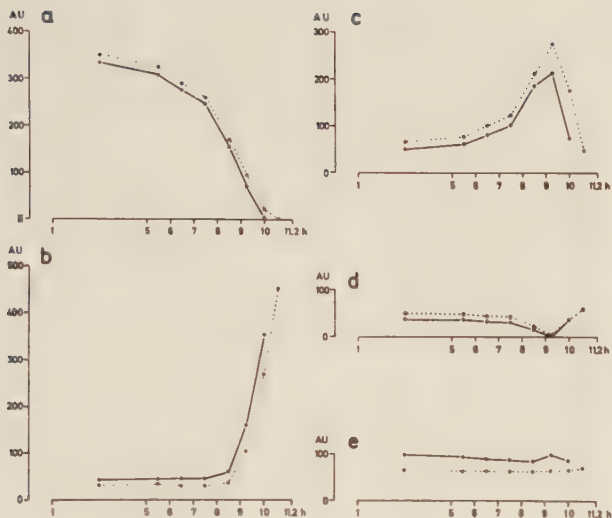


Fig. 10

Aktivitätsmuster der in Tab.3 definierten Puffgruppen.
 Ordinate: Gesamtaktivität derjenigen Loci, die einer bestimmten Gruppe angehören. Zur Definition der AU siehe Mat.und Meth.

Abszisse: Stunden n.d.H.

o—o : genetische Aktivität zwischen 1 und 10h n.d.H.
 o...o : genetische Aktivität zwischen 1 und 11,2h n.d.H., unter Berücksichtigung des Präparats, das ein sehr spätes Stadium der puffing-Periode repräsentierte (vgl. S.26). Für die in diesem Präparat nicht beobachteten Chromosomenabschnitte wurde die Aktivität eingesetzt, die in diesen Abschnitten 10h n.d.H. beobachtet worden war.

- a) Loci der Gruppe 1;
- b) Loci der Gruppe 2;
- c) Loci der Gruppe 3;
- d) Loci der Gruppe 4;
- e) Loci der Gruppe 5.

Tab. 3

Einordnung der aktiven Banden in verschiedene Gruppen.

Spalte A: Prozentualer Anteil ohne Berücksichtigung des Präparats, das ein sehr spätes Stadium der puffing-Periode repräsentiert (s.Text).

Spalte B: Prozentualer Anteil mit Berücksichtigung dieses Präparats.

Spalte C: Genetische Aktivität in Prozenten der Gesamtaktivität des Genoms im Zeitraum vom 1-5h n.d.H.

Spalte D: Genetische Aktivität in Prozenten der Gesamtaktivität des Genoms im Zeitraum von 10-11,2h n.d.H.

Gruppe	Charakterisierung	A	B	C	D
1	Loci mit abnehmender Aktivität	37,5	36,5	62,1	0,2
2	Loci mit zunehmender Aktivität:				
	a) vor der Aktivitätszunahme bereits aktiv	6,1	4,9	5,7	16,0
	b) vor der Aktivitätszunahme nicht aktiv	23,5	23,9	0	56,0
3	Loci mit vorübergehender Aktivitätszunahme:				
	a) vor der Aktivitätszunahme bereits aktiv	4,5	6,2	11,9	4,4
	b) vor der Aktivitätszunahme nicht aktiv	10,3	13,8	0	2,8
4	Loci mit vorübergehender Aktivitätsabnahme	4,2	6,3	8,7	9,1
5	Loci mit konstanter Aktivität	13,9	8,4	11,6	11,5

daß die Loci einer Gruppe ihre Aktivität relativ synchron verändern. Die Synchronie dieser Veränderungen bringt es mit sich, daß die puffing-Periode in drei Phasen aufgliedert werden kann (Fig.11).

In der ersten Phase der puffing-Periode überwiegt die Aktivität der Loci, die der Gruppe 1 angehören, d.h. die noch vor der Pupariumbildung inaktiv werden. Der Beginn dieser Phase ist nicht genau festzulegen. Da jedoch im Zeitraum zwischen 5 und 6h n.d.H. drei Banden aktiv werden, die nur während der puffing-Periode aktiv sind (12B2, 29F6 und 68F3), wird der Beginn der ersten Phase auf 5h n.d.H. festgelegt.

In der zweiten Phase, die sich über den Zeitraum von annähernd 8-10h n.d.H. erstreckt, überwiegt die Aktivität der Loci mit vorübergehender Aktivitätszunahme (Gruppe 3). Im gleichen Zeitraum weisen die Loci mit vorübergehender Aktivitätsabnahme (Gruppe 4) ein Aktivitätsminimum auf. Diese beiden Gruppen verhalten sich somit "spiegelbildlich".

In der dritten Phase schließlich, die ungefähr eine Stunde vor der Pupariumbildung beginnt, überwiegt die Aktivität der zur Gruppe 2 gehörenden Loci, d.h. der Loci mit Aktivitätszunahme. 78 % dieser Aktivität sind auf Loci zurückzuführen, die erst 8h n.d.H. oder noch später aktiv werden (Tab.3, Spalte D).

Die Postulierung der dritten Phase begründet sich auf die Auswertung des bereits erwähnten Präparats, das ein stark fortgeschrittenes Stadium der puffing-Periode auf-

Fig. 11

Die zeitliche Beziehung zwischen den zu beobachtenden Änderungen genetischer Aktivität in den Puffgruppen 1-4.

Ordinate: Aktivität in Prozenten der jeweils vorhandenen Gesamtaktivität des Genoms;

Abszisse: Stunden n.d.H.

○—○ : Loci der Gruppe 1;

○—○ : Loci der Gruppe 2;

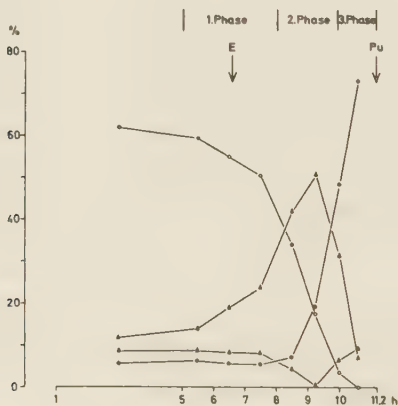
△—△ : Loci der Gruppe 3;

▲—▲ : Loci der Gruppe 4;

E = Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung;

Pu = Zeitpunkt der Pupariumbildung.

Außerdem sind die Grenzen der 1., 2. und 3. Phase der puffing-Periode markiert.



wies (S.26). Berücksichtigt man dieses Präparat nicht, so sind nur die beiden ersten Phasen erfaßbar; von der dritten Phase ist lediglich die Einleitung, d.h. die beginnende Zunahme der genetischen Aktivität der zur Gruppe 2 gehörenden Loci erkennbar. Da jedoch die gewonnenen Ergebnisse mit und ohne Berücksichtigung dieses Präparats identisch sind (vgl.Fig.10), erscheint die Postulierung der dritten Phase als gerechtfertigt. Die Tatsache, daß in diesem Präparat 8 % des Genoms nicht beobachtet werden konnten, dürfte die Ergebnisse nur graduell aber nicht prinzipiell beeinflussen, da z.B. 10h n.d.H. die in diesen Chromosomenbereichen aktiven Querscheiben an der zu diesem Zeitpunkt nachweisbaren Gesamtaktivität (in AU) nur mit 3 % beteiligt waren.

4) Diskussion

Das entscheidende entwicklungsphysiologische Ereignis, das im Zeitraum zwischen dem Hochkriechen und der Pupariumbildung eintritt, ist die Ausschüttung des Ecdysons aus der Ringdrüse in die Hämolymphe. Es ist bekannt, daß dieses Hormon die Pupariumbildung und die damit in Verbindung stehenden physiologischen und biochemischen Prozesse induziert (34). Die geschilderten Experimente haben gezeigt, daß bei *D.virilis* die Ecdysonausschüttung 6,6h n.d.H. eintritt. Zwei Stunden später beginnt die Ausschüttung des in den Drüsenzellen gespeicherten Sekrets in das Drüsenlumen. 4,6h nach der Ecdysonausschüttung erfolgt die Pupariumbildung (Fig.12).

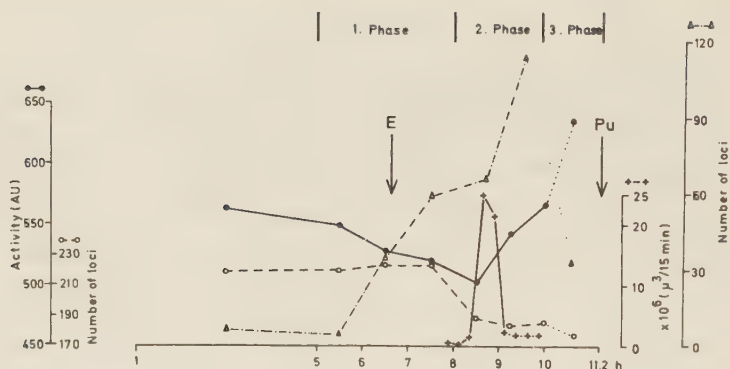


Fig. 12

Verschiedene entwicklungsphysiologische Ereignisse bei weiblichen Larven in den letzten 11 Stunden vor der Pupariumbildung.

Abszisse: Stunden n.d.H.

E = Zeitpunkt der Ecdysoneausschüttung;

Pu = Zeitpunkt der Pupariumbildung.

●—● : Gesamtaktivität des Genoms (s.S. 9);

○—○ : Anzahl aktiver Banden;

△---△ : Anzahl der Banden, die in dem auf der Abszisse angegebenen Zeitintervall mit der Änderung ihrer Aktivität beginnen. Bei den Loci der Gruppen 3 und 4 (Tab.3) ist nur der Beginn der ersten Veränderung in die Kurve aufgenommen. Bei Berücksichtigung der 2. Änderung müßten in die letzten vier Intervalle (7-11,2h) die Werte 62, 70, 171 und 63 eingesetzt werden.

+—+ : durchschnittliche Zunahme des Volumens im distalen Abschnitt des Speicheldrüsenlumens (in $\mu^3/15 \text{ min}$).

Den im Zeitintervall 10,0-11,2h n.d.H. angegebenen Werten liegt nur die Analyse des Präparats zugrunde, das ein sehr spätes Stadium der puffing-Periode repräsentierte (vgl. S. 26).

Aus der zeitlichen Reihenfolge allein ergibt sich allerdings noch kein kausaler Zusammenhang zwischen der Freisetzung des Ecdysons und der Extrusion des Sekrets bzw. der Pupariumbildung. Bezüglich der Pupariumbildung ist dieser Zusammenhang jedoch seit langem bekannt (34). Die durch Injektion von Ecdysteron in Larven von *D.hydei* induzierte Sekretausschüttung (35) legt eine Abhängigkeit auch dieses Vorgangs von der Ecdysonausschüttung nahe.

Bei *D.melanogaster* konnte Becker durch Schnürungsversuche den Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung auf den Zeitraum von 3,5-5h vor der Pupariumbildung begrenzen (27). Zwischen diesen und den bei *D.virilis* durchgeführten Schnürungsversuchen besteht allerdings ein grundlegender Unterschied. Während bei *D.virilis* das Alter der Larven beim Schnüren bekannt war, schnürte Becker Larven, deren Alter nicht bekannt war. Er konnte daher nur indirekt aus dem Zeitintervall zwischen Schnürung und Pupariumbildung auf den Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung schließen. Da bei *D.virilis* nach dem Schnüren eine Entwicklungsverzögerung beobachtet wurde, die bei den sich nur vor der Ligatur verpuppenden Larven zu einem verspäteten Eintreten der Pupariumbildung führte und dies wahrscheinlich auch für *D.melanogaster* zutrifft (vgl.(27), Tab.2, Spalte VI), dürfte der von Becker angegebene Zeitraum zu groß sein. Setzt man voraus, daß auch bei *D.melanogaster* vo- und ga-Larven in unterschiedlichem Maße nach dem Schnüren absterben (vgl. S.17), so wird auch dieser

Effekt neben der verzögerten Entwicklung zu einer Vergrößerung des Zeitraums zwischen Ecdysonausschüttung und Pupariumbildung führen. Unter Berücksichtigung dieser durch das Schnüren hervorgerufenen Erscheinungen wird man den Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung im Zeitraum von 3,5-4h vor der Pupariumbildung zu suchen haben, wobei man auch diese Angabe nur als Schätzung bewerten darf. Es besteht somit keine Möglichkeit zu entscheiden, ob bei beiden Arten das Intervall zwischen Ecdysonausschüttung und Pupariumbildung gleich ist, oder ob bei *D.melanogaster*, entsprechend der kürzeren Gesamtentwicklungsdauer, dieses Intervall kleiner ist.

Bei verschiedenen Dipterenarten wurden durch Injektion von Ecdyson bereits innerhalb von 15-30 min Änderungen des Puffmusters induziert (28, 29, 36). Man würde demnach erwarten, daß in der Normalentwicklung im Zeitraum der Ecdysonausschüttung ein verstärktes Auftreten von Veränderungen des Puffmusters zu beobachten ist. Bei *D.melanogaster* wurde ein derartiger zeitlicher Zusammenhang auf indirekte Weise wahrscheinlich gemacht (27); in den hier vorliegenden Untersuchungen konnte er in der Normalentwicklung direkt beobachtet werden und auch experimentell durch Injektion von Ecdyson (siehe Teil II) bestätigt werden. Während in dem Zeitraum vom Hochkriechen der Larven bis 6h n.d.H. nur 10 Puffs ihre Aktivität veränderten, war in dem sich anschließenden Zeitraum eine sprunghafte Zunahme der Anzahl von Loci zu registrieren, die mit der Änderung ihrer Aktivität begannen (Fig.12, Δ --- Δ). Der Beginn dieser Zunahme lag zwischen

6 und 7h n.d.H., also in dem Zeitraum, in dem auch die Ecdysonausschüttung stattfand. Von den 34 Banden, an denen in diesem Zeitraum die Veränderung der Aktivität begann, gehörten 30 den Gruppen 1 und 3 an. An drei Banden (12B2, 68F3 und 41E hatte die Veränderung schon früher als 6h n.d.H. begonnen (vgl. Tafeln 2, 3 und 5) und wurde nach diesem Zeitpunkt nur noch intensiviert. Es muß in diesem Zusammenhang betont werden, daß der durch die Schnürungen ermittelte Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung nur den Zeitpunkt repräsentiert, bei dem der Hormontiter in der Hämolymphe einen Wert erreicht hat, bei dem die Sklerotisierung der Kutikula auch ohne weitere Hormonzufuhr von der Ringdrüse her ablaufen kann. Es besteht somit keine Möglichkeit zu unterscheiden, ob die Ausschüttung tatsächlich nur zu diesem Zeitpunkt erfolgt oder ob schon vor diesem Zeitpunkt ein Anstieg des Hormontiters in der Hämolymphe auftritt. Im letzten Falle könnten die oben genannten, früher als 6h n.d.H. aufgetretenen Veränderungen Banden betreffen, die bereits auf geringe Hormonkonzentrationen mit einer Veränderung ihrer Aktivität reagieren. Für eine derartige Interpretation spricht der Befund, daß zwei dieser Veränderungen (41E und 68F3) durch Injektion von Ecdyson zu induzieren waren (vgl. Tafeln 3 und 5).

Bei den in Fig.12 angegebenen Veränderungen pro Zeitintervall ist jede sich verändernde Bande nur einmal registriert, d.h. bei Banden mit vorübergehender Aktivitätszunahme oder -abnahme wurde nur der Beginn der ersten

Veränderung in die Figur aufgenommen. Aus der in Fig.12 dargestellten Kurve ($\Delta --- \Delta$) ist daher zu ersehen, daß im Verlauf der puffing-Periode immer neue Loci von der Welle der Aktivitätsveränderungen ergriffen werden. Diese Periode zeichnet sich somit durch eine qualitative Umstrukturierung der Aktivität des Genoms aus, die ein Maximum im Zeitraum zwischen 9 und 10h n.d.H. erreicht.

Diese qualitativen Veränderungen sind verbunden mit quantitativen Veränderungen der genetischen Aktivität. Im Verlauf der ersten Phase der puffing-Periode ist eine allgemeine Abnahme genetischer Aktivität festzustellen, während in der 2. und 3.Phase die Aktivität wieder zunimmt (Fig.12, ●-●). Insgesamt erhöht sich die genetische Aktivität geringfügig von 562 AU (1-5h n.d.H.) auf 635 AU (10,0-11,2h n.d.H.), d.h. um das 1,1-fache. Die Anzahl der Loci nimmt im gleichen Zeitraum ab (Fig.12, o-o), so daß sich die durchschnittliche Aktivität der aktiven Banden erhöht (um das 1,4-fache).

Diese Befunde stehen im Widerspruch zu den von Ashburner angegebenen Daten für *D.melanogaster* (26). Aus den Figuren 16 und 17 seiner Arbeit ist zu entnehmen, daß in den letzten zehn Stunden vor der Pupariumbildung die Anzahl aktiver Puffs um das 2,3-fache zunimmt und daß gleichzeitig auch die durchschnittliche Größe der Puffs um das 2,3-fache zunimmt. Betrachtet man die Puffgröße als relatives Maß für die genetische Aktivität der Puffs (vgl.S.9), so würde bei *D.melanogaster* in dem angegebenen Zeitraum die genetische Aktivität um das 5,3-fache ansteigen (bei *D.virilis* nur um das 1,13-fache).

Dieser Unterschied in den Ergebnissen ist wahrscheinlich auf die Verschiedenartigkeit der angewandten Methoden zurückzuführen. Während Ashburner nur rein morphologische Kriterien (Aufschwellen und diffuse Natur der Chromomeren) verwendete, konnte mit der bei *D.virilis* angewendeten Methylgrün-Pyronin-Färbung Aktivität auch an Chromomeren festgestellt werden, die im ungefärbten

Zustand wahrscheinlich keine mit Sicherheit nachzuweisende Veränderung erkennen lassen. Last man unter diesem Gesichtspunkt in dem bei *D.virilis* gewonnenen Material die beiden Aktivitätsklassen von 1 und 2 AU unberücksichtigt, so ergibt sich ein den Ashburner'schen Ergebnissen im Prinzip analoges Bild: die Anzahl aktiver Loci nimmt in dem zur Diskussion stehenden Zeitraum um das 1,2-fache zu, die durchschnittliche Aktivität der Puffs (AU/Locus) um das 1,1-fache.

Die Loci, die im Zeitraum zwischen dem Hochkriechen und der Pupariumbildung aktiv sind, wurden gemäß ihrem Verhalten in fünf verschiedene Gruppen aufgegliedert (Tab.3). Ähnliche Unterschiede in der Aktivitätsveränderung einzelner Loci sind auch bei anderen Dipterenarten beschrieben worden (14, 26, 37, 38, 39). Bei *D.virilis* treten diese Veränderungen in einer charakteristischen Reihenfolge auf, so daß drei aufeinanderfolgende Phasen postuliert wurden, in denen jeweils die Puffs einer bestimmten Gruppe in ihrer Aktivität dominieren (Fig.11). Eine im Prinzip gleichartige Aufeinanderfolge verschiedener Phasen wurde bisher nur von Clever (37) bei *Chironomus* beschrieben.

Von den beobachteten Veränderungen genetischer Aktivität sind drei Gruppen von besonderer Bedeutung. Die Aktivität derjenigen Loci, die vor der Pupariumbildung inaktiv werden (Gruppe 1) und deren Aktivität in der ersten Phase der puffing-Periode noch dominiert, dürften wahrscheinlich im Zusammenhang mit Stoffwechselvorgängen stehen, die für die larvale Entwicklungsphase charakteristisch sind und die vor der Pupariumbildung zum Erlöschen kommen. Ein derartiger Vorgang ist z.B. die in der 2.Hälfte des dritten Larvenstadiums als Hauptfunktion

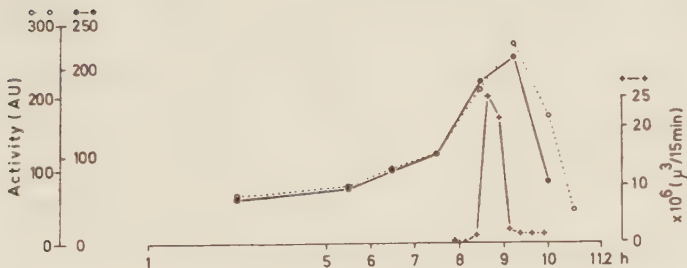
der Speicheldrüse zu betrachtende Synthese des Sekrets, das kurz vor der Pupariumbildung in das Lumen ausgeschüttet wird. Man darf annehmen, daß diese Synthese vor oder während der Extrusion des Sekrets beendet wird. Wie gezeigt werden konnte, beginnt die Extrusion 8,5h n.d.H., ist nach 30-40 min fast abgeklungen und erstreckt sich auf ganz niedrigem Niveau wahrscheinlich bis zur Pupariumbildung (vgl.S.24). Sie findet somit in dem Zeitraum statt, in dem die Loci inaktiv werden, deren Aktivität vor der Sekretausschüttung 62,1 % der Gesamtaktivität des Genoms repräsentieren (Tab.3, Gruppe1, Spalte C; Fig.11). Ein experimenteller Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang der Sekretsynthese und einem Locus der Gruppe 1 (Puff 55E) soll im zweiten Teil der Arbeit näher besprochen werden.

Die für die zweite Phase der puffing-Periode charakteristischen Veränderungen genetischer Aktivität, nämlich die vorübergehende Aktivierung bzw. Inaktivierung bestimmter Loci (Gruppe 3 und Gruppe 4), treten synchron mit der Extrusion auf (Fig.13). Es ist daher naheliegend, einen kausalen Zusammenhang zwischen beiden Vorgängen zu suchen. Leider ist über die Biochemie der Extrusion bei Dipteren wenig bekannt. Es scheint jedoch allgemein für Zellen mit sekretorischer Funktion charakteristisch zu sein, daß ihr Energieverbrauch in beträchtlichem Maße auf Transportvorgänge zurückzuführen ist, während der Energieverbrauch bei der Sekretsynthese relativ gering sein dürfte (40). Dies würde in unserem Falle bedeuten,

Fig. 13

Zeitliche Korrelation zwischen der Extrusion des Sekrets und der vorübergehenden Zunahme genetischer Aktivität in der Puffgruppe 3. Bezüglich der Puffgruppe 4 vergleiche man die "Spiegelbildlichkeit" der Veränderung in beiden Gruppen (vgl. Fig.11).

- : genetische Aktivität zwischen 1 und 10h n.d.H.
- : genetische Aktivität zwischen 1 und 11,2h n.d.H., unter Berücksichtigung des Präparats, das ein sehr spätes Stadium der puffing-Periode repräsentierte (vgl. S.26). Für die in diesem Präparat nicht beobachteten Chromosomenabschnitte wurde die Aktivität eingesetzt, die in diesen Abschnitten 10h n.d.H. beobachtet worden war.
- +—+ : Durchschnittliche Zunahme des Volumens im distalen Abschnitt des Speicheldrüsenlumens (in $\mu^3/15 \text{ min}$).



daß in der Phase der Extrusion mehr Energie verbraucht wird als in der vor ihr liegenden Periode der Sekret-synthese; es läge somit ein Übergang von einem relativ "inaktiven" in einen "aktiven" Zustand der Zellen vor. Vom biochemischen Standpunkt aus betrachtet ist ein derartiger Übergang u.a. durch die Steigerung des Elektronenflusses in der Atmungskette zum Sauerstoff hin gekennzeichnet, so daß die Redoxpartner der Kette vermehrt im oxydierten Zustand vorliegen (41). Experimentell lassen sich diese Bedingungen durch Behandlung mit Entkopplern der Atmungskette, Methylenblau oder Menadion erzeugen. Leenders (42) konnte bei *D. hydei* durch in-vitro-Inkubation von Drüsen in Medien, die diese Substanzen enthielten, u.a. zwei Puffs induzieren (2-48C und 2-36A), die in der Normalentwicklung 4h vor der Pupariumbildung aktiv werden und kurz nach der Pupariumbildung ihre Aktivität wieder verlieren (14). Vielleicht liegt hier ein experimenteller Hinweis dafür vor, daß vorübergehende Veränderungen des Puffmusters im Zeitraum der Pupariumbildung mit einer möglichen Intensivierung des Energiestoffwechsels im gleichen Zeitraum in Verbindung stehen konnten. Es ist daher denkbar, daß der in Fig.13 dargestellten zeitlichen Korrelation zwischen der Extrusion und der vorübergehenden Aktivierung bestimmter Loci ein derartiger Zusammenhang zugrunde liegt.

In der dritten Phase der puffing-Periode dominiert die Aktivität der Loci der 2.Gruppe (Fig.11), von denen 80 % erst 8h n.d.H. oder noch später aktiv werden

(Tab.3, 2b, Spalte D). In dieser Phase scheinen die Grundlagen für neue biochemische Abläufe in der Speicheldrüse gelegt zu werden, die entweder für die Pupariumbildung oder für das sich anschließende Vorpuppenstadium charakteristisch sind. In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, daß bei *D.melanogaster* nach der Pupariumbildung in der Speicheldrüse große Sekretvakuolen gebildet werden, die sich morphologisch deutlich von den während des dritten Larvenstadiums gebildeten Sekretgrana unterscheiden (43); vermutlich beruht dieses unterschiedliche Erscheinungsbild auf einer Verschiedenheit der biochemischen Zusammensetzung.

Die biochemischen Vorgänge, die sich im Verlauf der letzten Stunden des dritten Larvenstadiums bei *Drosophila* in der Speicheldrüse abspielen, scheinen somit dadurch gekennzeichnet zu sein, daß vor der Pupariumbildung ein bis dahin aktives Syntheseprogramm stillgelegt wird, während nach der Pupariumbildung ein neues Syntheseprogramm in Gang gebracht wird. Diese hypothetische "Umfunktionierung" der Syntheseleistung der Drüse fände auf chromosomaler Ebene ihr Analogon in der Beobachtung, daß diejenigen Loci, deren Aktivität im Zeitraum von 1-5h n.d.H. 62,1 % der Gesamtaktivität des Genoms repräsentieren, vor der Pupariumbildung inaktiv werden (Tab.3, Gruppe 1, Spalten C und D) während im Zeitraum von 10-11,2h n.d.H. 56 % der Gesamtaktivität des Genoms (Tab.3, Gruppe 2b, Spalte D) auf Loci zurückzuführen sind, die erst 8h n.d.H. oder noch später aktiv geworden

sind. Mit anderen Worten: während die Aktivität eines Teils des Genoms in dem untersuchten Zeitraum anteilmäßig relativ unverändert geblieben ist (Tab.3, Gruppen 3,4 und 5, Spalten C und D), wurde die Aktivität eines bis zur Extrusion des Sekrets aktiven Komplexes von Genen durch die Aktivität eines völlig anderen Genkomplexes ersetzt.

Konnten bei anderen Dipteren in verschiedenen Bereichen der larvalen Speicheldrüse unterschiedliche Syntheseleistungen der Zellen mit der Aktivität bzw. Inaktivität bestimmter Puffs korreliert werden (31, 44), so sind die bei *D.virilis* geschilderten Vorgänge ein Hinweis dafür, daß in verschiedenen Entwicklungsstadien die gleichen Zellen verschiedene Aufgaben erfüllen können und daß diese zeitabhängige funktionelle Verschiedenheit der Zellen ihr Äquivalent findet in der Aktivität jeweils anderer Teile des Genoms.

II. Teil: Injektionsexperimente

- 1) Substanzunspezifische Injektionseffekte
- a) Beeinflussung des Zeitpunkts der Ecdysonausschüttung

Im Zusammenhang mit den Schnürungsexperimenten ist erwähnt worden, daß bei geschnürten Larven, die sich nur vor der Ligatur verpuppten, die Pupariumbildung verspätet eintrat (vgl.S.30). Es bestand daher die Möglichkeit, daß auch durch die Injektion eine Entwicklungsverzögerung induziert wird. Um diese Frage zu prüfen, wurden im Zeitraum von 1-2h n.d.H. jeweils 0,2 µl Tris/HCl-Puffer in Larven injiziert und diese Larven fünf Stunden später, also 6-7h n.d.H., geschnürt. Wie aus Tab.4 zu ersenen ist, wurde bei diesen Larven die Häufigkeit der Sklerotisierung hinter der Ligatur gegenüber der Häufigkeit bei Larven, die vor dem Schnüren keine Injektion erhalten hatten, stark reduziert.

Durch die unterschiedliche Sensibilität von vo- und ga-Larven beim Schnüren wird im Experiment ein zu hoher relativer Anteil von ga-Larven erhalten (vgl.S.17). Die in Tab.4,b angewendete Berechnungsart liefert relative Anteilwerte, die den korrigierten Werten (Fig.7a, Kurve II) sehr nahe kommen, so daß diese Art der Erhebung gegenüber der in Tab.4,a verwendeten der Vorzug zu geben ist.

Dieser Unterschied ist entweder darauf zurückzuführen, daß in Larven, die vor dem Schnüren eine Injektion erhalten hatten, so wenig Ecdyson ausgeschüttet wurde, daß die Sklerotisierung nicht induziert werden konnte und somit eine Weiterentwicklung nicht möglich war. Es ist aber auch denkbar, daß die für die Weiterentwicklung notwendige, in vollem Umfang ablaufende Ecdysonausschüttung nach der Injektion zwar eintrat, jedoch nicht innerhalb

Tab. 4

Die Beeinflussung der Sklerotisierungshäufigkeit hinter der Ligatur durch Injektion von 0,2 μ l Tris-HCl-Puffer 5 Stunden vor der Schnürung der Larven.

	A	B	C	D
(a) $\frac{ga}{vo + ga}$	0,10	0,47	0,77	0,034
(b) $\frac{hi_s}{hi_w + hi_s}$	0,04	0,36	0,64	0,002

Es wurden zwei verschiedene Erhebungen durchgeführt.

(a) vo= Larven, die nach dem Schnüren nur vor der Ligatur Sklerotisierung aufwiesen und hinter der Ligatur weiß blieben;

ga= Larven, die nach dem Schnüren vor und hinter der Ligatur Sklerotisierung aufwiesen.

(b) Bei dieser Erhebung wurde nur der hinter der Ligatur gelegene Larventeil betrachtet. Auf diese Weise konnten auch Larven gewertet werden, die vor der Ligatur abgestorben waren.

hi_s = Larven, die nach dem Schnüren hinter der Ligatur Sklerotisierung aufwiesen;

hi_w = Larven, die nach dem Schnüren hinter der Ligatur weiß blieben.

A: Häufigkeit der Sklerotisierung bei Larven, die vor dem Schnüren eine Injektion erhalten hatten. Die Injektionen erfolgten zwischen 1 und 2h n.d.H., die Schnürungen zwischen 6 und 7h n.d.H.

B und C: Häufigkeit der Sklerotisierung bei Larven, die vor dem Schnüren unbehandelt blieben;

B: Schnürung 6h n.d.H.;

C: Schnürung 7h n.d.H.

D: Wahrscheinlichkeit p für die Übereinstimmung (= Homogenität) der in A und B angegebenen Häufigkeiten. p wurde nach dem Vierfelder- χ^2 -Test (zweiseitig) bestimmt (30).

der ersten fünf Stunden danach, was zur Folge hätte, gab sich in diesem Zeitraum der Ecdysontiter nicht erhöhte. Von den beiden Möglichkeiten erscheint die zuletzt genannte wahrscheinlicher, da sich aus Larven, die eine Injektion erhalten haben, zumindest äußerlich völlig normale Imagines entwickeln können.

b) Die Reaktionen des Puffmusters auf die Injektion

In den larvalen Speicheldrüsen von Dipteren kann das Puffmuster durch eine Reihe unspezifischer Agentien beeinflusst werden (45). Auf der Suche nach einer spezifischen Reaktion des Genoms waren daher unspezifische, d.h. allein durch die Injektion bedingte Veränderungen von möglichen spezifischen Reaktionen zu trennen. Es sollen zunächst die unspezifischen Reaktionen besprochen werden. Diese waren nach Injektion verschiedener Testlösungen identisch, d.h. sie waren nicht von der Zusammensetzung der injizierten Lösungen abhängig. Dagegen war das Muster dieser Veränderungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion unterschiedlich. Deshalb werden bei der Besprechung dieser Effekte die Injektionen nur als "1h-Behandlung", "5h-Behandlung" usw. bezeichnet.

Bevor aber im Einzelnen auf die verschiedenen Reaktionen des Genoms eingegangen wird, müssen im Zusammenhang mit ihrer Registrierung und Beurteilung noch einige einleitende Bemerkungen gemacht werden. In der Normalentwicklung beginnt die puffing-Periode im Zeitraum zwischen 5-6h n.d.H. In diesen Zeitraum fällt u.a. die Aktivierung der Bande 68F3, die nur wäh-

rend der puffing-Periode aktiv ist (vgl. Tafel 5).

An der Inaktivität bzw. Aktivität dieser Bande konnte daher ersehen werden, ob sich die Chromosomen eines bestimmten Präparats in der puffing-Periode befanden oder nicht, ohne das gesamte Puffmuster analysieren zu müssen. Puffmuster, die eine inaktive Bande 68F3 aufwiesen, wurden als Typ-I, solche, die eine aktive Bande 68F3 aufwiesen, als Typ-II bezeichnet.

In behandelten Larven traten diese beiden Typen ebenfalls auf. Es war aber insofern ein Unterschied zwischen beiden Larvengruppen, als sowohl im Typ-I als auch im Typ-II-Puffmuster behandelter Larven Veränderungen auftraten, die durch die Injektion hervorgerufen wurden. Es mußte daher das Typ-I-Puffmuster unbehandelter Larven (= Typ-I_{ub}; ub steht für unbehandelt) vom Typ-I-Puffmuster behandelter Larven (= Typ-I_b; b steht für behandelt) unterschieden werden. Eine analoge Unterscheidung wurde auch beim Typ-II-Puffmuster getroffen.

Alle Injektionen wurden im Zeitraum zwischen 1 und 2h n.d.H. durchgeführt. Die maximale Behandlungsdauer betrug fünf Stunden. Bezogen auf das Puffmuster zum Zeitpunkt der Injektion war mit zunehmender Behandlungsdauer im Typ-I_b-Puffmuster zunächst eine Zunahme und anschließend eine Abnahme der Anzahl von veränderten Loci zu beobachten (Tab.5, Zeile 1). Die einzelnen Veränderungen traten dabei zu ganz verschiedenen Zeitpunkten auf und konnten auch von unterschiedlicher Dauer sein (Fig.14).

Tab. 5

Veränderungen innerhalb des Typ-I_b-Puffmusters:

Anzahl veränderter Loci, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von 0,2 μ l H₂O registriert wurden.

	0,5h	1h	3h	5h
Gesamtanzahl von				
Veränderungen	66 (100%)	82 (100%)	49 (100%)	32 (100%)
der Normalentwicklung				
vergleichbare	64	72	69	70
Veränderungen (%)				
abnorme Veränderungen				
aktiver Loci (%)	27	21	12	9
"neue" aktive Loci (%)	9	7	19	21

Wie aus Tab.5 zu ersehen ist, waren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion 9-27 % der Veränderungen auf abnorme Reaktionen zum Zeitpunkt der Injektion bereits aktiver Banden zurückzuführen; ihr relativer Anteil nahm mit zunehmender Behandlungsdauer ab (Zeile 3). Dagegen nahm der Anteil von Veränderungen zu, die an Banden beobachtet wurden, die in der Normalentwicklung nie in aktivem Zustand angetroffen wurden (Zeile 4). Der weitaus

Fig. 14

Das Auftreten von Veränderungen im Typ-I_b-Puffmuster zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von 0,2 μ l H₂O.

Ordinate: Anzahl der Veränderungen;

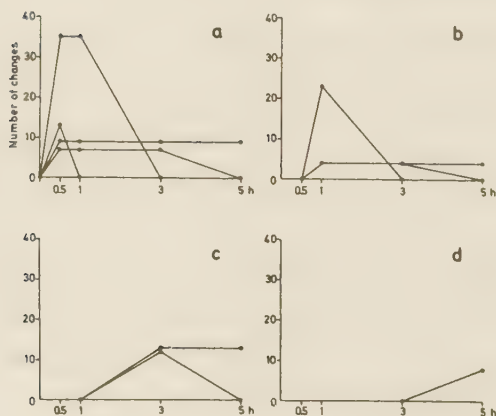
Abszisse: Stunden nach Injektion.

Die Veränderungen sind nach dem Zeitpunkt des ersten Auftretens geordnet:

- a) 0,5h nach Injektion;
- b) 1h nach Injektion;
- c) 3h nach Injektion;
- d) 5h nach Injektion.

Die Diagramme sind wie folgt zu lesen (beispielsweise Diagramm a):

- 13 Loci waren nur nach 0,5h verändert,
- 35 Loci waren nach 0,5 und 1h verändert,
- 7 Loci waren von 0,5 bis 3h verändert,
- 9 Loci waren von 0,5 bis 5h verändert.



größte Teil der in behandelten Larven beobachteten Veränderungen, nämlich 64-72 %, trat auch in der Normalentwicklung auf (Zeile 2); ihr relativer Anteil blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum annähernd konstant. Bei der Interpretation dieser Veränderungen als Injektionseffekte müssen jene Veränderungen unberücksichtigt bleiben, die auch in der Normalentwicklung auftraten, und zwar in dem Zeitraum, der bei den Injektionsexperimenten zwischen Injektion und Präparation lag. Man kann bei diesen Veränderungen nicht entscheiden, ob ihr Auftreten durch die Injektion induziert wurde oder einen normalen Entwicklungsablauf widerspiegelt. Dies gilt allerdings nur für 7 von insgesamt 90 mit normaler Änderung reagierender Banden. Die restlichen 83 normal erscheinenden Veränderungen müssen als Injektionseffekte interpretiert werden, weil sie nach Injektion wesentlich früher auftraten als in der Normalentwicklung. Die Änderungen, die z.B. nur nach 0,5 und 1h-Behandlung, d.h. im Zeitraum von 1,5-3h n.d.H. beobachtet wurden, waren in der Normalentwicklung zu 96 % für den Zeitraum von 6-11,2h n.d.H. charakteristisch (Fig.15a). Es wurden somit im Typ I_b-Puffmuster durch die Injektion Veränderungen induziert, die in der Normalentwicklung zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt, nämlich während der puffing-Periode, einsetzen. Als markantes Beispiel sei der Puff 76 DE erwähnt, der in der Normalentwicklung zwischen 9,5 und 10h n.d.H. aktiv wird (Tafel 5). Zu einem ähnlichen Resultat, wenn auch nicht so eindeutig, führt die Betrachtung der-

Fig. 15

Die im Typ-I_b-Puffmuster beobachteten normalen Veränderungen und die zeitliche Verteilung ihres Auftretens in der Normalentwicklung.

Abszisse: Zeitintervalle der Normalentwicklung in Stunden n.d.H.

Ordinate: Anzahl der in behandelten Larven beobachteten normalen Veränderungen. Jede Veränderung ist in das Zeitintervall gesetzt, in dem sie in der Normalentwicklung beginnt.

a) Nach 0,5 und 1h-Behandlung;

J = Zeitraum der Injektionen;

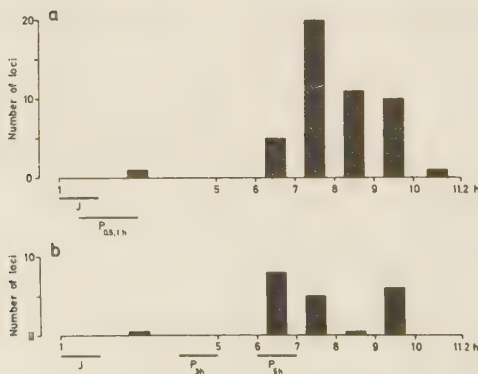
$P_{0,5;1h}$ = Zeitraum, in dem die Präparationen nach 0,5 und 1h-Behandlung durchgeführt wurden.

b) Nach 3h und 5h-Behandlung;

J = Zeitraum der Injektionen;

P_{3h} = Zeitraum der Präparation nach 3h-Behandlung;

P_{5h} = Zeitraum der Präparation nach 5h-Behandlung.



jenigen normalen Veränderungen, die nach 3h- und 5h-Be-
handlung auftraten (Fig.15b).

Auf Grund des Auftretens von Veränderungen im Typ-I_b-
Puffmuster, die in der Normalentwicklung für die puffing-
Periode charakteristisch sind, mag es zunächst zweifel-
haft erscheinen, in behandelten Larven eine Unterscheidung
zwischen Typ-I_b- und Typ-II_b-Puffmuster durchzuführen.
Dieses Vorgehen ist jedoch gerechtfertigt, da die im
Typ-I_b-Puffmuster auftretenden Veränderungen der puffing-
Periode zu 80 % an Loci auftraten, die der Gruppe 1 (Tab.3)
angehören. Diese Loci wiesen nach Injektion eine vorzei-
tige Abnahme ihrer Aktivität auf. Veränderungen dieser Art
sind für die puffing-Periode weniger charakteristisch als
die Aktivierung von Loci, die nur während der puffing-
Periode aktiv sind (z.B. 68F3) oder während der puffing-
Periode ihre Aktivität vorübergehend erhöhen (z.B. 41E).
Derartige Veränderungen waren jedoch kennzeichnend für das
Typ-II_b-Puffmuster. So wurde z.B. von den 47 Loci, die in
der Normalentwicklung im Zeitraum zwischen 5-10h n.d.H.
eine vorübergehende Aktivitätszunahme aufwiesen, auch an
35 eine Aktivitätszunahme im Typ-II_b-Puffmuster registriert,
im Typ-I_b-Puffmuster dagegen nur einem Locus.

Das Puffmuster vom Typ-II_b ist durch die Aktivität
der Bande 68r3 gekennzeichnet. Puffmuster dieses Typs
traten nach 5h-Behandlung mit einer Häufigkeit von 31 %
auf (n= 142). Der Zeitraum der Präparation nach 5h-Be-
handlung lag zwischen 6 und 7h n.d.H. In diesem Zeitraum
waren in der Normalentwicklung Puffmuster von Typ-II_{ub}
mit einer Häufigkeit von 74 % (n= 23) vertreten. Man
könnte zunächst die Erniedrigung des Anteils von Drüsen,
deren Chromosomen bereits in die puffing-Periode einge-
treten sind, als Entwicklungsverzögerung interpretieren.
Sollte nach Injektion die Entwicklung nur verlangsamt
werden, so dürfte sich, abgesehen von den Injektions-
effekten, das Typ-II_b-Puffmuster nicht vom Typ-II_{ub}-Puff-
muster unterscheiden. Diese Annahme konnte jedoch nicht
bestätigt werden.

Vergleicht man die Puffmuster vom Typ-II_b und Typ-II_{ub}, so zeigt es sich, daß von 313 Veränderungen, die in unbehandelten Larven im Zeitraum von 5-11,2h n.d.H. beobachtet wurden, nur 127 (40 %) auch in behandelten Larven nachzuweisen waren (vgl. Tafeln 2-6;b).

In 17 Präparaten 5h-behandelter Larven wurde das gesamte Puffmuster analysiert. Diese Puffmuster wurden so aneinander gereiht, daß die Aktivität der Bande 68F3, links von 0 AU ausgehend, immer mehr zunahm. Dies ergab eine sequentielle Abfolge von Puffmusterveränderungen, die im Prinzip derjenigen der Normalentwicklung entspricht (vgl. Fig.9) und einen Übergang vom Typ-I_b - in das Typ-II_b-Puffmuster darstellt. Es wurden nur solche Veränderungen als "normal" registriert (z.B. die 127 oben genannten), die im Verlauf dieser Puffmustersequenz zu beobachten waren, da bei ihnen angenommen werden kann, daß sie im Zusammenhang mit Vorgängen auftraten, die in der Normalentwicklung den in der puffing-Periode zu beobachtenden Veränderungen zugrunde liegen. Normale Änderungen, die bereits im Typ-I_b-Puffmuster aufgetreten waren, d.h. in allen analysierten Präparaten, wurden nicht berücksichtigt (vgl.Fig.15b), da sie als Injektionseffekte zu interpretieren sind (siehe auch Tafeln 2-6,b).

Die Mehrzahl dieser Veränderungen ist in der Normalentwicklung für die erste Phase der puffing-Periode charakteristisch. Die in der Normalentwicklung in der 2. und 3. Phase der puffing-Periode auftretenden Veränderungen konnten im Typ-II_b-Puffmuster nur zu einem geringen Prozentsatz gefunden werden (Fig.16). Auf Grund der Altersstreuung der Larven (vgl. Mat. und Meth.) dürfte das physiologische Alter der Mehrzahl der im Zeitraum P_{5h} (vgl. Fig.16) präparierten Larven im Bereich von 5-8h n.d.H. liegen, d.h. in der ersten Phase der puffing-Periode. Veränderungen, die in der Normalentwicklung für diese Phase charakteristisch sind und auch nach 5h-Behandlung vorgefunden wurden, können somit als Folge einer normalen Weiterentwicklung interpretiert werden. Die in der Normal-

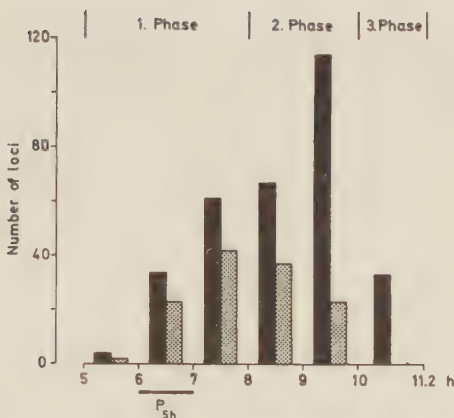


Fig. 16

Die im Typ-II_b-Puffmuster beobachteten normalen Veränderungen und die zeitliche Verteilung ihres Auftretens in der Normalentwicklung.

Abszisse: Zeitintervalle der Normalentwicklung in Stunden n.d.H.

Ordinate: Anzahl veränderter Loci;

schwarze Säulen: Anzahl der Loci, die in der Normalentwicklung in dem auf der Abszisse angegebenen Zeitintervall mit der Veränderung ihrer Aktivität beginnen. Bei den Loci der Gruppen 3 und 4 (Tab.3) ist nur der Beginn der ersten Veränderung berücksichtigt (vgl.Fig.12);

punktierte Säulen: Anzahl der normalen Veränderungen, die im Typ-II_b-Puffmuster beobachtet wurden und in der Normalentwicklung in dem auf der Abszisse angegebenen Zeitintervall mit der Veränderung ihrer Aktivität beginnen (siehe auch Tafeln 2-6,b).

P_{5h}: Zeitraum, in dem die 5h-behandelten Larven präpariert wurden.

entwicklung später als 8h n.d.H. in Erscheinung tretenden Veränderungen, die im Typ-II_b-Puffmuster beobachtet wurden, könnten entweder auf Larven mit relativ fortgeschrittenem Alter zurückzuführen sein oder auf vorzeitige, durch die Injektion hervorgerufene Induktion, wie sie im Typ-I_b-Puffmuster von 5h-behandelten Larven beobachtet wurde (vgl.Fig.15b).

Der größte Teil der in der Normalentwicklung im Verlauf der puffing-Periode auftretenden Veränderungen konnte nach 5h-Behandlung nicht beobachtet werden. Die Erniedrigung der Häufigkeit des Typ-II-Puffmusters von 74% auf 31% nach 5h-Behandlung beruht somit nicht auf einer bloßen Verzögerung der Entwicklung, sondern auf einem Entwicklungsstillstand in dem hier untersuchten Zeitraum von 5 Stunden.

"Entwicklungsstillstand" ist in diesem Zusammenhang nicht mit dem Tod der Larve gleichzusetzen. Der Begriff soll so verstanden werden, daß durch die Injektion die fortschreitende Entwicklung der Larve unterbrochen wird und auf einem bestimmten Stadium stehen bleibt. Der Grundstoffwechsel der Zellen wird dadurch nicht beeinträchtigt, Außerdem ist es denkbar, daß bestimmte, "vorprogrammierte" Entwicklungsabläufe auch unter diesen Bedingungen noch in Erscheinung treten können, wenn auch wahrscheinlich nur für kurze Zeit. Derartige Vorgänge wären z.B. die im Typ-II_b-Puffmuster als "normal" registrierten Veränderungen. Die restlichen normalen Veränderungen, die im Typ-II_b-Puffmuster nicht beobachtet werden konnten, wären demnach in ihrem Auftreten von der ungestörten Weiterentwicklung abhängig.

Mit diesem Entwicklungsstillstand verbunden könnte der Ausfall eines spezifischen Stimulus (wahrscheinlich Ecdyson, vgl.S.39) sein, der für die komplizierte Abfolge sämtlicher im Verlauf der puffing-Periode auftretender Veränderungen unentbehrlich ist.

Neben den beiden bisher beschriebenen Puffmustern war noch ein dritter Typ (Typ-III) zu beobachten. In ihm traten Veränderungen auf, die weder in der Normalentwicklung noch generell nach Injektion beobachtet wurden. Puffmuster dieses Typs wurden bereits nach 3h-Behandlung registriert, nach 5h-Behandlung betrug ihre Häufigkeit 23 % (n= 142), wobei die für diesen Typ charakteristischen Veränderungen unterschiedlich stark ausgeprägt sein konnten. Das erste Anzeichen für das Vorliegen eines Typ-III-Puffmusters war die Violettfärbung der Bande 64B2. Mit zunehmender Aktivität dieser Bande traten noch weitere abnorme Veränderungen im Genom auf. Die auffallendsten waren die der Banden 62B4, 84A2, 37E1-2 und 45D1, die im ausgeprägten Typ-III-Puffmuster aktiv erschienen, während in der Normalentwicklung an ihnen nie Aktivität festgestellt werden konnte. Darüber hinaus vergrößerte sich das Volumen der Puffs 37B und 55E; sie erreichten hier maximale Größen, wie sie in der Normalentwicklung nie beobachtet wurden.

Die oben genannten abnormen Veränderungen konnten sowohl im Typ-I_b als auch im Typ-II_b-Puffmuster beobachtet werden. In beiden Fällen wurden die Puffmuster als Typ-III klassifiziert, wobei als Kriterium für das Vorliegen dieses Typs die Aktivität der Bande 64B2 verwendet wurde. Puffmuster vom Typ-III wurden als abnorm betrachtet und folglich bei der Erhebung der unspezifischen und spezifischen Reaktionen des Genoms auf die Injektionen nicht berücksichtigt.

2) Substanzspezifische Effekte

a) Injektion von Ecdyson

Die Injektionen wurden im Zeitraum von 1-2h n.d.H. durchgeführt. Die Präparation der Drüsen erfolgte entweder 1/2 oder 1h nach der Injektion. In die Kontrollarven wurde H₂O dest. injiziert. Für die Beurteilung der Ecdysonwirkung standen 6 Präparate der 1/2h- und 8 Präparate der 1h-Inkubation zur Verfügung.

Bereits nach 1/2-stündiger Inkubation wurde in sämtlichen Drüsen das Puffmuster vom Typ-II (= Typ-II_{Eb}; Eb steht für Ecdyson-behandelt) vorgefunden. Ein Teil der für die puffing-Periode charakteristischen Veränderungen war in allen Drüsen durch Ecdyson induziert worden. Insgesamt konnte an 118 verschiedenen Banden nach Ecdyson-injektion ein Unterschied der Aktivität gegenüber derjenigen nach H₂O-Injektion festgestellt werden. Davon sind 31 Aktivitätsveränderungen als abnorm zu bezeichnen (Tab.6).

Tab. 6

Ecdyson-induzierte Veränderungen, die in der Normalentwicklung nicht beobachtet wurden. Die Einwirkungsdauer des Hormons betrug maximal 1 Stunde.

Normalentwicklung	H ₂ O	Ecdyson	Anzahl	Effekt
konstant inaktiv	aktiv	inaktiv	3	stabilisiert
konstant inaktiv	inaktiv	aktiv	4	induziert
konstant aktiv	inaktiv	aktiv	4	stabilisiert
konstant aktiv	aktiv	inaktiv	2	reprimiert
inaktiv→aktiv	aktiv	inaktiv	3	stabilisiert
aktiv→inaktiv	aktiv	superaktiv	5	induziert
aktiv→inaktiv	inaktiv	aktiv	10	stabilisiert

Die restlichen 87 Veränderungen, die aus den Tafeln 2-6;c zu ersehen sind, traten auch in der Normalentwicklung auf, repräsentieren aber nur 27 % aller Veränderungen, die im Zeitraum zwischen 1 und 11,2h n.d.H. zu beobachten waren. Es muß jedoch erwähnt werden, daß bereits in den Kontrollen an 37 Banden sowohl 0,5h als auch 1h nach Injektion eine normale Änderung aufgetreten war, so daß eine mögliche Wirkung des Hormons an ihnen nicht nachgewiesen werden konnte. Weiterhin kann nicht beurteilt werden, ob durch die experimentellen Bedingungen normale Reaktionen des Genoms auf Ecdyson unterdrückt wurden.

Geht man der Frage nach, wann die durch Ecdyson induzierten Veränderungen in der Normalentwicklung auftreten, so kommt man zu der Feststellung, daß der Anteil Ecdyson-induzierbarer Veränderungen an den in einem bestimmten Zeitintervall der Normalentwicklung auftretenden Veränderungen immer geringer wird, je später diese in der Normalentwicklung auftreten (Fig.17). Eine Interpretation dieses Befunds wird in der Diskussion gegeben werden.

b) Injektion von Metaboliten des Glucosaminstoffwechsels und von Asaserin

Die Injektionen erfolgten im Zeitraum von 1-2h n.d.H., die Präparation der Drüsen wurde 5 Stunden später, also zwischen 6 und 7h n.d.H. durchgeführt. Insgesamt konnten die Chromosomen von 142 Larven, die eine Injektion erhalten hatten, analysiert werden.

Eine spezifische Reaktion auf mindestens eine der injizierten Testsubstanzen wurde an dem Puff im Unter-

Fig. 17

Die durch Injektion von Ecdyson induzierten 87 normalen Veränderungen und die zeitliche Verteilung ihres Auftretens in der Normalentwicklung.

Abszisse: Zeitintervalle der Normalentwicklung in Stunden n.d.H.

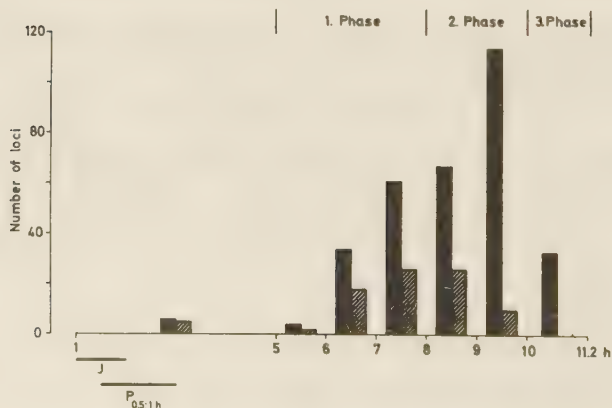
Ordinate: Anzahl veränderter Loci;

schwarze Säulen: Anzahl der Loci, die in der Normalentwicklung in dem auf der Abszisse angegebenen Zeitintervall mit der Veränderung ihrer Aktivität beginnen. Bei den Loci der Gruppen 3 und 4 (Tab.3) ist nur der Beginn der ersten Veränderung berücksichtigt (vgl.Fig.12);

schraffierte Säulen: Anzahl der normalen Veränderungen, die durch Injektion von Ecdyson induziert wurden und in der Normalentwicklung in dem auf der Abszisse angegebenen Intervall mit der Änderung ihrer Aktivität beginnen.

J : Zeitraum, in dem die Injektionen durchgeführt wurden;

P_{0,5;1h} : Zeitraum, in dem die Drüsen nach 0,5- und 1-stündiger Inkubation präpariert wurden.



abschnitt 55E des dritten Chromosoms festgestellt. Die Aktivität dieses Puffs nimmt in der Normalentwicklung nach dem Hochkriechen der Larven stetig ab (Fig.20a). Dieser Puff weist deshalb im Typ-I_{ub}-Puffmuster ein höheres Aktivitätsniveau auf als im Typ-II_{ub}-Puffmuster. Analoge Verhältnisse findet man beim Vergleich der Puffmuster vom Typ-I_b und vom Typ-II_b. Betrachtet man die Aktivität des Puffs 55E in den beiden zuletzt genannten Typen, so wird das Spektrum von volliger Inaktivität bis zu submaximaler Aktivität erfaßt (Fig.18a). In der Mehrzahl der Injektionsserien liegt der Schwerpunkt der Puffaktivität im Bereich um und über 0,5. Eine Ausnahme davon macht die Serie, in der Glucosamin injiziert wurde; hier erscheint die Aktivität dieses Puffs im Durchschnitt geringer als in den übrigen Serien. Da die verminderte Aktivität des Puffs 55E im Puffmuster vom Typ-II_b sowieso zu erwarten ist, kann man den möglichen reduzierenden Effekt von Glucosamin nur in dem Puffmuster untersuchen, in dem nach Injektion von Kontrollösungen keine Reduktion der Aktivität auftritt, d.h. im Typ-I_b-Puffmuster. Bei ihm zeigen sich in den mittleren Aktivitäten des Puffs 55E Unterschiede zwischen den verschiedenen Testserien, die statistisch erfaßbar sind (Fig.18b). Die durchschnittliche Aktivität des Puffs nach Injektion von Azaserin ist identisch mit derjenigen in den beiden Kontrollserien; diese Substanz hatte somit keinen Effekt. Den restlichen drei Testserien aber ist eine Reduktion der durchschnittlichen Aktivität des Puffs gemeinsam, wobei der Grad der Reduktion in den

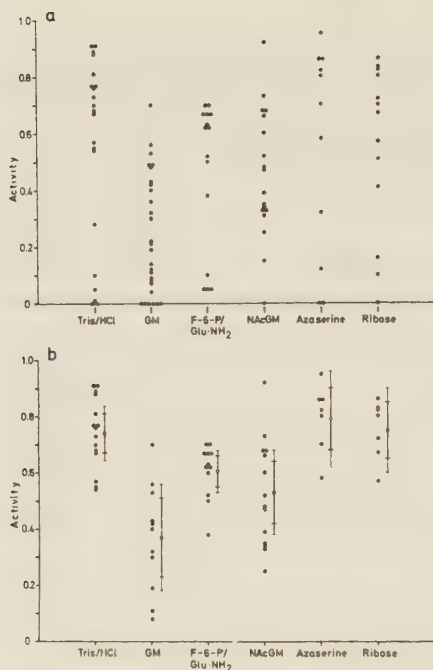


Fig. 18

Die Aktivität des Puffs 55E fünf Stunden nach Injektion von Kontrolllösungen, Metaboliten des Glucosaminstoffwechsels und von Azaserin. Die Testsubstanzen waren in einer Konzentration von 10^{-2} M/l gelöst. Es wurden jeweils 0,2 μ l Lösung injiziert. Jeder Punkt repräsentiert die mittlere Aktivität des Puffs in einem Drüsenpaar.

Ordinate : relative Aktivität des Puffs bezogen auf seine maximale Aktivität (s.S.48).

Abkürzungen der Testsubstanzen:

GM = Glucosamin; F-6-P = Fructose-6-phosphat;

Glu·NH₂ = Glutamin; NAcGM = N-Acetylglucosamin.

a) Aktivitäten des Puffs im Typ-I_b- und Typ-II_b-Puffmuster.

b) Aktivitäten des Puffs im Typ-I_b-Puffmuster. Die Vertrauensbereiche der Gruppenmittel wurden nach dem t-Test für $p = 0,05$ und $0,01$ berechnet (30).

einzelnen Serien verschieden ist. Die durchschnittliche Aktivität nach Injektion von F-6-P/Glu·NH₂ ist zwar vermindert, der Unterschied zu den Kontrollen konnte jedoch statistisch nicht gesichert werden. Bei $p = 0,05$ tritt sowohl nach Injektion von GM als auch von NAcGM eine signifikante Abnahme der Aktivität auf, bei $p = 0,01$ ist die Abnahme nur nach Injektion von GM statistisch gesichert (Abb.2).

Während somit nach Injektion von Kontrollsubstanzen der Puff 55E im Typ-I_b-Puffmuster eine Aktivität aufwies, die derjenigen zum Zeitpunkt der Injektion entsprach, trat nach Injektion von GM eine Abnahme der Aktivität auf, wie sie in der Normalentwicklung im gleichen Zeitraum zu beobachten war (Fig.20, a und b). Nach Injektion von GM wurde offenbar die in den Kontrollserien aufgetretene Hemmung der Aktivitätsabnahme unterdrückt.

3) Diskussion

Mehrere experimentelle Daten sprechen dafür, daß in dem Zeitraum von 5h nach Injektion die Ecdysonausschüttung nicht erfolgte und dementsprechend der Ecdysontiter der Hämolymphe sich nicht erhöhte. Diese Befunde sollen, kurz gefaßt, noch einmal genannt werden:

- a) Bei Larven, die 5 Stunden vor dem Schnüren eine Injektion erhielten, wurde die Häufigkeit der Sklerotisierung hinter der Ligatur stark reduziert (S.39).
- b) 5 Stunden nach Injektion war die Häufigkeit von Drüsen, die ein Typ-II-Puffmuster aufwiesen stark reduziert (S.45).

- c) Im Typ-II_b-Puffmuster traten nur 40% der Veränderungen auf, die im Typ-II_{ub}-Puffmuster zu beobachten waren (S.46).

Diese Beobachtungen sind am einfachsten mit dem Ausbleiben der Ecdysonausschüttung nach Injektion zu erklären.

Diese Erklärungsmöglichkeit ist allerdings nicht die einzige. Man kann den unter a) angeführten Befund auch mit einer Veränderung der Kompetenz der Kutikula gegenüber Ecdyson erklären, welche als Folge eines Wundeffekts auftreten könnte (z.B. Erhöhung der Reaktionsschwelle). Daß die Reaktionsfähigkeit als solche nach der Injektion erhalten geblieben ist, beweist das Auftreten von vo-Larven fünf Stunden später (Tab.4,a). Eine Verletzung der Kutikula ist unwahrscheinlich, da die Injektion durch After und Darm erfolgte.

Außerdem spricht noch eine andere Beobachtung mehr für die Verzögerung der Ecdysonausschüttung als für eine veränderte Kompetenz der Kutikula. Nach dem Schnüren von Larven, die vorher keine Injektion erhalten hatten, trat bei solchen, die das Ecdyson bereits ausgeschüttet hatten (= ga-Larven), die Sklerotisierung bereits innerhalb weniger Stunden ein, während bei Larven, bei denen die Ecdysonausschüttung erst nach dem Schnüren erfolgte (= vo-Larven), die Sklerotisierung bis zu einem Tag später auftreten konnte, obwohl sie innerhalb von wenigen Stunden nach dem Schnüren zu erwarten war. In solchen Larven war die Ecdysonausschüttung sicher verzögert, da es unter Berücksichtigung des möglichen raschen Abbaus von Ecdyson (46) unwahrscheinlich ist, daß der für die Auslösung der Sklerotisierung nötige Ecdysontiter nach einmaliger Ausschüttung über einen derartig langen Zeitraum aufrecht erhalten wurde.

Auch die unter b) und c) angeführten Befunde lassen sich anders interpretieren. Sowohl die verringerte Häufigkeit als auch die Unvollständigkeit des Typ-II-Puffmusters in behandelten Larven könnte eine Folge der Veränderung der Hämolymphe sein, die durch die Injektion der Testlösung verursacht wird. Die veränderte Zusammensetzung der Hämolymphe dürfte auch das zellinterne Milieu der Speicheldrüse beeinflussen, die als relativ "offenes System" gegenüber der Hämolymphe betrachtet werden muß. Diese beiden zuletzt genannten Befunde können daher nur als schwache Stützen für das Postulat gelten, daß nach der Injektion die Ecdysonausschüttung nicht zum normalen Zeitpunkt eintritt, sondern später.

Für die in den ersten fünf Stunden nach Injektion beobachteten normalen Veränderungen des Puffmusters scheint demnach die induzierende Wirkung des Ecdysons nicht in

Frage zu kommen. Es müssen deshalb für diese Veränderungen andere Faktoren verantwortlich gemacht werden, deren Natur zunächst unbekannt bleibt. Aus dem Resultat einer vergleichenden Betrachtung der Veränderungen, die in der Normalentwicklung auftraten und der unspezifischen und spezifischen Veränderungen des Puffmusters, die nach Injektion verschiedener Testlösungen auftraten, lassen sich jedoch einige Schlüsse ziehen. Diese Betrachtungen sollen im Folgenden angestellt werden.

Das Puffmuster der Riesenchromosomen in den larvalen Speicheldrüsen muß als der sichtbare Ausdruck eines labilen Regulationsgleichgewichts betrachtet werden, das zwischen regulierenden Faktoren des cyto- und karyoplasmatischen Raumes einerseits und der Aktivität des Genoms andererseits besteht. Tritt in einem der beiden Gleichgewichtspartner eine Veränderung auf, so wird der andere Partner mit einer bestimmten Reaktion antworten und so die Einstellung eines neuen Gleichgewichts herbeiführen. Auf diese Weise lassen sich z.B. jene Veränderungen des Puffmusters interpretieren, die *in vitro* und *in vivo* experimentell induziert werden können (11, 45); jede experimentelle Manipulation muß zu einer Störung dieses Regulationsgleichgewichts führen.

Auf der Basis dieses Gleichgewichts kann angenommen werden, daß die im Verlauf der verschiedenen Phasen der puffing-Periode auftretenden Veränderungen des Puffmusters von einer kontinuierlich sich verändernden Zusammensetzung des Pools von regulierenden Faktoren des

cyto- und karyoplasmatischen Raumes gesteuert werden. Diese Vorstellungen sollen an Hand des in Fig.19 wiedergegebenen Schemas näher erläutert werden.

Wenn die Larven das Futter verlassen haben, ist der cyto- und karyoplasmatische Raum (= zellinterner Raum) durch die Anwesenheit bestimmter zellinterner Faktoren charakterisiert, die in ihrer Gesamtheit mit FI_{ub} symbolisiert werden. Diese Faktoren bilden ein zellinternes Milieu, das mit einem bestimmten Aktivitätsmuster des Genoms im Gleichgewicht steht, welches an den Chromosomen als charakteristisches Puffmuster vom Typ- I_{ub} erscheint (Fig.19, Pfeil 1). Im Laufe der Weiterentwicklung verändert sich die Zusammensetzung des Pools von zellinternen Faktoren von FI_{ub} nach FII_{ub}^1 (Pfeil 2 in Fig.19).

Eine Erklärung für diesen Vorgang kann nicht gegeben werden. Es kann jedoch mit Sicherheit angenommen werden, daß die Integration von externen Faktoren der Hämolymphe dabei eine wichtige Rolle spielt. Da sie, mit Ausnahme des Ecdysons, qualitativ und quantitativ nicht zu erfassen sind, werden sie in dem Schema nicht aufgeführt. Als weitere Ursache für diese Veränderung kommt die sich ändernde Aktivität des Genoms in Frage, dessen Produkte direkt oder indirekt am Aufbau des Pools beteiligt sein dürften (Fig.19, Pfeil 3).

Die Faktoren FII_{ub}^1 stehen mit dem Puffmuster vom Typ- II_{ub}^1 im Gleichgewicht, das für die erste Phase der puffing-Periode charakteristisch ist.

In der Normalentwicklung treten die Puffs der ersten Phase der puffing-Periode in dem Zeitraum auf, in dem auch die Ecdysonausschüttung stattfindet (vgl. Fig.12). Da Veränderungen der ersten Phase auch durch Injektion von Ecdyson induziert wurden, besteht ein kausaler Zusammen-

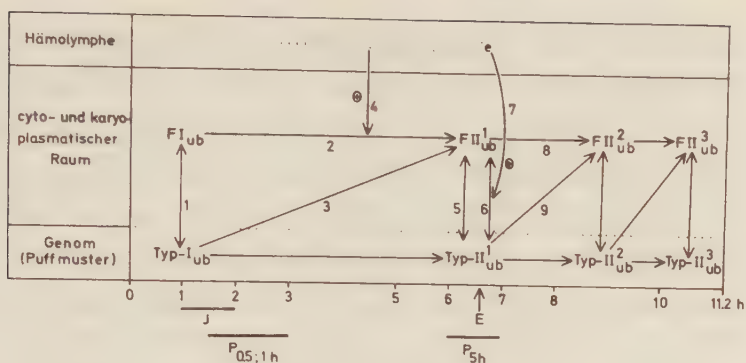


Fig. 19

Hypothetisches Schema der Wechselwirkungen zwischen regulierenden Faktoren des zellinternen Raums und der Aktivität des Genoms im Zeitraum zwischen dem Verlassen des Futters und der Pupariumbildung.
Zeitangaben in Stunden n.d.H.

E = experimentell bestimmter Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung;

e = Ecdyson als zellexterner Faktor. Die mögliche Zunahme der Ecdysonkonzentration vor dem Zeitpunkt E ist angedeutet;

FI_{ub} = Gesamtheit aller zellinterner Faktoren, die mit dem Puffmuster vom $Typ-I_{ub}$ im Gleichgewicht stehen;

FII_{ub} = Gesamtheit aller zellinterner Faktoren, die mit dem Puffmuster vom $Typ-II_{ub}$ im Gleichgewicht stehen. Die Indizes 1, 2 und 3 geben an, für welche Phase der puffing-Periode die Faktoren und das Puffmuster charakteristisch sind.

J = Zeitraum, in dem die Injektionen durchgeführt wurden;

$P_{0,5;1h}$ = Zeitraum, in dem die Drüsen nach Injektion von Ecdyson präpariert wurden;

P_{5h} = Zeitraum, in dem Drüsen 5h-behandelter Larven präpariert wurden.

Die genaue Erklärung des Schemas erfolgt im Text.

menhang zwischen beiden Vorgängen. Allerdings ist für das Zustandekommen des zellinternen Milieus, das mit dem Puffmuster vom Typ-II¹_{ub} im Gleichgewicht steht, Ecdyson allein nicht verantwortlich zu machen, da die Injektion des Hormons im Zeitraum J nach 1-stündiger Inkubation nur 46 % der für die erste Phase der puffing-Periode charakteristischen Veränderungen hervorruft (Tab.7;C). Man kann diesen Befund so erklären, daß zum Zeitpunkt der Injektion des Hormons der Pool der Faktoren FII¹_{ub} noch unvollständig war und daher auch die Reaktion des Genoms nicht vollständig sein konnte.

Als Alternative zu dieser Interpretation ließe sich die unvollständige Reaktion des Genoms auf die Injektion von Ecdyson auch mit einer sich ändernden Ansprechbarkeit des Genoms auf Ecdyson erklären, die im Zeitraum J (1-2h n.d.H.) geringer wäre als im Zeitraum 5-8h n.d.H. Eine Änderung der Kompetenz entspräche einem Differenzierungsvorgang; ein solcher ist in einem so spezialisierten Organ wie der Speicheldrüse in diesem Entwicklungsstadium unwahrscheinlich. Des weiteren ist die Zeitspanne zwischen den beiden in Frage kommenden Zeitintervallen so kurz, daß Veränderungen in der biochemischen Zusammensetzung des zellulären Milieus mehr in Betracht zu ziehen sind als Differenzierungsvorgänge an den Chromosomen, die mit strukturellen Veränderungen an definierten Orten der Chromosomen verbunden sein müßten (47).

Außerdem sei noch erwähnt, daß nicht entschieden werden kann, ob die experimentelle Applikation des Hormons tatsächlich die Wirkung des in situ-Hormons vollständig imitieren kann, bzw. ob durch die Injektion nicht normale Reaktionen des Genoms auf Ecdyson unterdrückt werden. Ein Überdosiseffekt (29) scheint bei der hier verwendeten Konzentration nicht in Frage zu kommen, da ein solcher bei D.hydei nach Injektion derselben Menge Ecdysterons, das biologisch aktiver ist als Ecdyson, nicht beobachtet wurde (48).

Es wird somit postuliert, daß für die vollständige Ausprägung des Puffmusters vom Typ-II¹_{ub} die gleichzeitige Anwesenheit der Faktoren FII¹_{ub} und des Ecdysons erforderlich ist. Der Punkt, an dem das Ecdyson in das Regulations-

geschehen eingreift, ist allerdings unklar. Eine Möglichkeit besteht darin, daß das Ecdyson am Aufbau des Pools der Faktoren FII_{ub}^1 beteiligt ist (Fig.19, Pfeil 4); dies könnte aus folgendem Befund abgeleitet werden: im Zeitraum P_{5h} betrug die Häufigkeit von Drüsen mit dem Puffmuster vom Typ-II_b 31 % und die von solchen mit dem Typ-II_{ub}-Puffmuster dagegen 74 %. Offenbar wurde in 5h-behandelten Larven der Pool jener Faktoren, die für die Veränderungen im Typ-II_b-Puffmuster dieser Larven verantwortlich gemacht werden müssen, langsamer aufgebaut als in unbehandelten Larven.

Bei der oben angeführten Interpretation wurde vorausgesetzt, daß die Faktoren FII_{ub}^1 direkt die Aktivität des Genoms regulieren (Fig.19, Pfeil 5). Es besteht jedoch Grund zu der Annahme, daß die Wirkung eines Teils dieser Faktoren (Fig.19, Pfeil 6) durch Ecdyson beeinflusst wird (Fig.19, Pfeil 7). Es sprechen vor allem zwei Befunde dafür:

- 1) 89 % der durch Ecdyson induzierten Veränderungen, die in der ersten Phase der puffing-Periode beginnen, wurden auch im Typ-II_b-Puffmuster beobachtet (Tab.7, D; Hilfstabelle zu den Tafeln 2-6, Spalte A), d.h. bei Abwesenheit von Ecdyson. Diese Veränderungen werden daher primär durch zellinterne Faktoren reguliert und erst sekundär durch Ecdyson (Fig.19, Pfeil 6).
- 2) Der größte Teil der unter 1) genannten Veränderungen wurde nach Injektion von Ecdyson innerhalb von 1/2 Stunde in 100 % der Drüsen beobachtet. Fünf Stunden

nach Injektion von Lösungen, die kein Ecdyson enthielten, waren in nur 31 % der Drüsen diese Veränderungen festzustellen. Die Faktoren, die für diese Veränderungen verantwortlich sind, wurden somit durch die Injektion von Ecdyson sofort aktiviert (Fig.19, Pfeil 7), während bei Abwesenheit des Hormons die Aktivierung einen wesentlich längeren Zeitraum beansprucht.

Nach dem bisher Gesagten scheint die Funktion des Ecdysons beim Zustandekommen der in der ersten Phase der puffing-Periode auftretenden Veränderungen vielfältig zu sein. Primär werden diese Aktivitätsveränderungen wahrscheinlich durch zellinterne Faktoren gesteuert, da 89 % der Veränderungen dieser Phase, die durch Injektion von Ecdyson induziert werden konnten, auch im Typ-II_b-Puffmuster beobachtet werden konnten, also unter Bedingungen, die eine Anwesenheit von Ecdyson wahrscheinlich ausschließen (Tab.7, D). Die restlichen 11 % Ecdyson-induzierten Veränderungen (Tab.7, C-D) der ersten Phase wurden auch im Typ-I_b-Puffmuster als Injektionseffekt registriert (vgl. Hilfstabelle zu den Tafeln 2-6, Spalte F). Keine der in der ersten Phase der puffing-Periode auftretenden Veränderungen konnte somit spezifisch durch Ecdyson induziert werden.

Wenn auch, diesen Beobachtungen zufolge, Ecdyson in dieser Phase der puffing-Periode keinen direkten Einfluß auf das Genom auszuüben scheint, so ist seine Anwesenheit dennoch eine Voraussetzung für den normalen Ablauf der

Tabelle 7

Die Häufigkeit des Beginns von Puffmusteränderungen in den drei Phasen der puffing-Periode und der Anteil der von diesen Veränderungen auch im Typ-II_b-Puffmuster und nach Injektion von Ecdyson beobachteten Veränderungen.

Phase	1	2	3
Zeitraum (Stunden n.d.H.)	5-8	8-10	10-11,2
Anzahl der beginnenden Veränderungen in der Normalentwicklung (A)	99	282	33
Anzahl der normalen Veränderungen im Typ-II _b -Puffmuster (B)	67	60	0
(B) in %-en von (A)	68	33	0
Anzahl der normalen Veränderungen nach Injektion von Ecdyson (C)	46	36	0
(C) in %-en von (A)	46	20	0
Anzahl der Veränderungen, die sowohl in (B) als auch in (C) auftraten (D)	41	23	0
(D) in %-en von (C)	89	64	0

in dieser Phase auftretenden Änderungen genetischer Aktivität. Während, wie gesagt, die Möglichkeit besteht, daß das Hormon am Aufbau des Pools von regulierenden, zell-internen Faktoren beteiligt ist, spielt es wahrscheinlich

die wichtigste Rolle bei der Aktivierung eines Teils dieser Faktoren. Offensichtlich wird diese Gruppe von Faktoren bei der Ausschüttung des Hormons, die zwischen 6 und 7h n.d.H. stattfindet, aktiviert und damit der Beginn der puffing-Periode induziert.

Die in dem Schema (Fig.19) für die 2. und 3. Phase der puffing-Periode angegebenen Wechselwirkungen sind eine konsequente Weiterführung der für die beiden davor liegenden Stadien postulierten Vorgänge. Der für das Puffmuster vom Typ-II_{ub}² verantwortliche Pool von Faktoren FII_{ub}² kann nur dann vollständig ausgebildet werden, wenn der Pool der Faktoren FII_{ub}¹ vollständig war. Auch die Vollständigkeit des Puffmusters vom Typ-II_{ub}¹ ist eine Voraussetzung dafür, da die an den Chromosomen produzierten RNA-Moleküle direkt oder indirekt am Aufbau des zellinternen Milieus der 2.Phase beteiligt sein dürften (Fig.19, Pfeile 8 und 9). Da aber das Puffmuster vom Typ-II_{ub}¹ sowohl nach 5h-Behandlung als auch nach Ecdysoninjektion nicht vollständig ausgeprägt war, ist es verständlich, daß in beiden Fällen Veränderungen des Puffmusters vom Typ-II_{ub}² in noch geringerem Umfange auftraten, was wiederum bewirkte, daß Veränderungen genetischer Aktivität der dritten Phase überhaupt nicht mehr beobachtet wurden (Tab.7).

Es ist erwähnenswert, daß nur neun (= 10%) von den durch Injektion von Ecdyson induzierten normalen Veränderungen, von einzelnen Ausnahmen abgesehen, weder im Typ-I_b- noch im Typ-II_b-Puffmuster beobachtet wurden

(Hilfstabelle zu den Tafeln 2-6, Spalte C). Dies würde bedeuten, daß diese Änderungen spezifisch durch Ecdyson induziert werden konnten. Acht dieser Veränderungen traten während der 2. und 3. Phase der puffing-Periode in der Normalentwicklung auf. Wie oben erläutert, sind nicht alle Veränderungen dieser beiden Phasen im Typ-II_b-Puffmuster zu erwarten, da nach 5h-Behandlung bereits ein Teil der Veränderungen der ersten Phase ausfällt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß das Fehlen der erwähnten acht Veränderungen im Typ-II_b-Puffmuster auf einem derartigen Zusammenhang beruht, so daß die Spezifität der Ecdysoninduktion für diese Veränderungen fraglich erscheint.

Es verbleibt somit noch eine Veränderung. Es handelt sich dabei um die zwischen 1 und 3h n.d.H. zunehmende Aktivität der Bande 75C2. An ihr wurde innerhalb der ersten Stunde nach Injektion von Lösungen, die kein Ecdyson enthielten, in 4 von 18 Präparaten Aktivität registriert. Nach Injektion von Ecdyson war im gleichen Zeitraum in 9 von 12 Präparaten an dieser Bande Aktivität nachzuweisen (nach dem Vierfelder- χ^2 -Test ist die Wahrscheinlichkeit für Homogenität beider Häufigkeiten gleich $p = 0,004$). Da die Aktivität der Bande 75C2 in der Normalentwicklung relativ früh zunimmt, könnte das Auftreten der Aktivität in den Kontrollarven auf solche zurückzuführen sein, die im Alter etwas fortgeschritten waren und sich bereits in einem Stadium befanden, in dem die Bande aktiv ist. Damit ist es wahrscheinlich, daß die Bande 75C2

spezifisch durch Injektion von Ecdyson aktiviert wird. Es wäre dies die einzige Bande im Genom, für die eine derartige Spezifität nachgewiesen worden wäre. Gleichzeitig wäre dies ein weiterer Hinweis dafür, daß in der Hämolymphe der Ecdyson-titer schon vor dem experimentell ermittelten Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung ansteigt (vgl. S.32).

In dieser Arbeit wurde postuliert, daß der Angriffspunkt des Ecdysons im intrazellulären Milieu zu suchen sei. Veränderungen dieses Milieus müßten demnach zu Änderungen der Ecdysonwirkung führen. Diese Annahme wird durch ^{gestützt} Befunde von Clever⁵, nach denen bei Chironomus die induzierende Wirkung des Ecdysons in vitro von dem Medium abhängig war, in dem die Drüsen inkubiert wurden (49). Ein weiterer Hinweis in dieser Richtung konnte von Berendes und Boyd erbracht werden (50). In isolierten Zellkernen der Speicheldrüsen von Drosophila hydei konnte Ecdyson keine Veränderungen an den Chromosomen induzieren. Da unter ihren Versuchsbedingungen sowohl Trinukleotide als auch RNA-Polymerase in die Kerne gelangen konnten, ist die Wirkungslosigkeit des Ecdysons eher auf das Fehlen des Cytoplasmas zurückzuführen als auf seine Unfähigkeit in den Kern zu gelangen. Es besteht allerdings die Möglichkeit, daß Ecdyson doch nicht in den Kern eintritt, wenn dazu cytoplasmatische Trägerproteine nötig sind (51). Für die Existenz von cytoplasmatischen Faktoren, mit denen Ecdyson in Wechselwirkung tritt, spricht weiterhin der Befund, daß bei Drosophila hydei die Induktion eines Puffs

Abb. 2

Aktivität der Bande 55E fünf Stunden nach Injektion von Kontrollösungen und von Glucosamin.

Die Präparate sind mit Methylgrün-Pyronin gefärbt.

a-b: nach Injektion von 0,2 μ l Tris/HCl-Puffer, 0,005 M, pH 6,9.

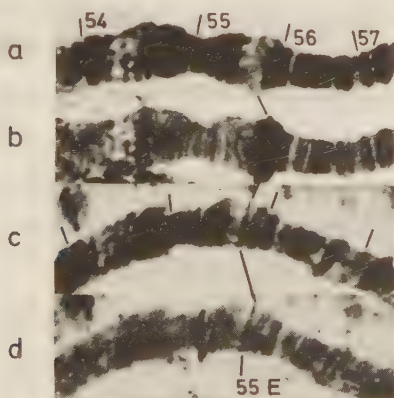
a: im Rotfilter;

b: im Grünfilter.

c-d: nach Injektion von 0,2 μ l Glucosamin, 10^{-2} M in $4 \cdot 10^{-3}$ M HCl, pH 7,0.

c: im Rotfilter;

d: im Grünfilter.



bei gleichzeitiger Anwesenheit von cyclischem AMP verstärkt wurde (52). Von Kroeger wurde die Hypothese aufgestellt, daß Ecdyson seine Wirkung auf das Genom über die Verschiebung von Ionengleichgewichten ausübt (53).

Eine Reihe von Veränderungen, die in der puffing-Periode von *Drosophila virilis* auftreten, scheinen mit Ecdyson in keinem Zusammenhang zu stehen (Fig.19, Pfeil 5). Dies gilt z.B. für 47 Veränderungen, die im Typ-II_b-Puffmuster beobachtet wurden, die aber durch Injektion von Ecdyson nicht induziert werden konnten. Als typisches Beispiel sei hier der Puff im Unterabschnitt 58F erwähnt, der 8h n.d.H. aktiv wird (Tafel 4). Auch die nach 0,5 und 1h-Behandlung im Typ-I_b-Puffmuster beobachteten normalen Veränderungen, die in der Normalentwicklung später als 6h n.d.H. eintraten (Fig.15a), könnten zu dieser Gruppe gehören, da ihre experimentelle Induktion unter Bedingungen eintrat, die eine Anwesenheit des Hormons in einer Konzentration, die zur Induktion dieser Veränderungen nötig ist, praktisch ausschließen.

Experimentelle Daten, die einen Einblick in die Natur jener zellinternen Faktoren geben, die für die Aufrechterhaltung eines bestimmten Aktivitätszustandes des Genoms verantwortlich sind, liegen bisher noch nicht vor. Vielleicht ist die in dieser Arbeit beschriebene Beeinflussung der Aktivität des Puffs 55E durch Injektion von Glucosamin ein Hinweis dafür, daß Metabolite in den Kreis dieser Faktoren gehören.

Nach den bei Mikroorganismen gewonnenen Vorstellungen können Metabolite die Aktivität von Genen regulieren, die für die Synthese von Enzymen verantwortlich sind, welche ihrerseits mit dem Stoffwechsel dieser Metabolite verknüpft sind (1). Unter der Voraussetzung, daß diese Beziehung auch bei Eukaryonten Gültigkeit besitzt, war es in Bezug auf die larvale Speicheldrüse von *D. virilis* naheliegend, nach einer möglichen Abhängigkeit der Aktivität des Genoms von Metaboliten des Glucosaminstoffwechsels zu suchen, da Glucosamin ein Bestandteil des in den Drüsen gebildeten Sekrets ist (15,16). Die Bildung dieses Aminosuckers geht von Fructose-6-phosphat aus. Die Existenz dieser Reaktionskette wurde zwar in den Speicheldrüsen nicht direkt nachgewiesen, es liegen jedoch einige Hinweise vor, die dafür sprechen. Bei der ersten Reaktion dieser Kette werden in einem Transaminierungsschritt aus Fructose-6-phosphat und Glutamin die Reaktionsprodukte Glucosamin-6-phosphat und Glutaminsäure gebildet. Glutaminsäure ist somit ein Abfallprodukt der Aminosuckerbildung und müßte in der Drüse, sofern sie nicht in andere Reaktionen eingeht, in größerer Konzentration vorliegen. Es konnte in der Tat nachgewiesen werden, daß bei *D. melanogaster* in der 2. Hälfte des dritten Larvenstadiums, also in dem Entwicklungsabschnitt, in dem das Sekret synthetisiert wird, der Anteil der Glutaminsäure an den freien Aminosäuren und Peptiden in der Speicheldrüse 10 mal so groß ist wie in der Hämolymphe (54). Bei der gleichen Art konnte weiterhin gezeigt werden, daß im gleichen Zeitraum

der Gehalt an freiem Glutamin in homogenisierten Larven sinkt (55). Des weiteren ist im gleichen Zeitraum eine Zunahme der Aktivität der Glutaminsynthetase zu beobachten (56), die man mit dem gesteigerten Verbrauch des Glutamins bei der Sekretsynthese in Zusammenhang bringen könnte.

Die Injektion verschiedener Metabolite des Glucosamin-stoffwechsels hat gezeigt, daß sich zumindest nach Injektion von Glucosamin die durchschnittliche Aktivität des Puffs 55E signifikant von dessen Aktivität in den Kontrollarven unterschied. Wenn auch der spezifische Wirkungsmechanismus noch nicht bekannt ist, der diesem Regulationssystem zugrunde liegt, so können doch einige Beobachtungen angeführt werden, die diesen Effekt nicht als Artefakt erscheinen lassen:

- 1) Die nach Injektion von Glucosamin beobachtete Abnahme der Aktivität des Puffs 55E ist charakteristisch für die Normalentwicklung (Fig.20a und b).
- 2) Der Puff 55E gehört in die Gruppe der Loci mit abnehmender Aktivität (Tab.3, Gruppe 1). Die genetische Aktivität dieser Gruppe dominiert vor und während der ersten Phase der puffing-Periode; es besteht daher Grund zu der Annahme, daß die Loci dieser Gruppe in Zusammenhang mit der Synthese des Sekrets stehen, das kurz vor der Pupariumbildung in das Drüsenlumen ausgeschüttet wird (vgl. Teil I, Diskussion S. 34).
- 3) Die Abnahme der Aktivität dieses Puffs ist auch durch Injektion von Ecdyson zu induzieren; allerdings wesent-

Fig. 20

Aktivität des Puffs 55E in der Normalentwicklung, nach Injektion von 0,2 μ l einer 10^{-2} molaren Glucosaminlösung und von 0,1 μ g Ecdyson.

Jeder Punkt repräsentiert die mittlere Aktivität des Puffs in einem Drüsenpaar.

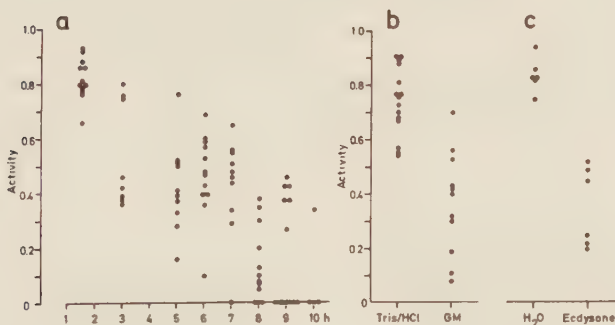
Ordinate: siehe Legende zu Fig.18;

a) Aktivitäten in der Normalentwicklung;

Abszisse: Stunden n.d.H.

b) Aktivitäten fünf Stunden nach Injektion von Tris/HCl-Puffer und von Glucosaminlösung (nur Typ-I₅-Puffmuster);

c) 0,5 Stunden nach Injektion von H₂O und von Ecdyson.



lich schneller als durch Injektion von Glucosamin. Dessen Effekt wird durch Ecdyson bereits innerhalb 1/2 Stunde erreicht (Fig.20b und c), nach 1-stündiger Einwirkung von Ecdyson ist der Puff völlig inaktiv.

- 4) In den Speicheldrüsen von Larven, die 1-2h n.d.H. präpariert wurden, war der Puff 55E immer aktiv. Dagegen war er inaktiv in den Chromosomen des Mitteldarms (Abb.3); in gefärbten Präparaten konnte keine Affinität für Pyronin festgestellt werden. Dieser Befund ist zu erwarten, wenn Mucoproteine nur in der Speicheldrüse synthetisiert werden und wenn die Aktivität dieses Puffs mit dem Stoffwechsel dieser Substanzen in Verbindung steht.

Abb. 3

Vergleich der Aktivität der Bande 55E in den Chromosomen des Mitteldarms und der Speicheldrüse. Beide Organe stammen jeweils von einer Larve, die im Zeitraum von 1-2h n.d.H. präpariert wurde.

a-c: in einem ungefärbten Quetschpräparat :

a und b: Chromosomen aus zwei Kernen des Mitteldarms;

c : Chromosom aus einem Kern der Speicheldrüse.

Die Grenzen der Chromosomenabschnitte sind durch Striche, die der Unterabschnitte durch Punkte markiert.

d-g: in einem mit Methylgrün-Pyronin gefärbten Präparat;

d-e: Chromosom in einem Kern des Mitteldarms:

d: im Rotfilter;

Soweit möglich, wurden die Grenzen der Chromosomenabschnitte durch Striche markiert.

e: im Grünfilter;

Die Bande 55E weist keine Rotfärbung auf. Zum Vergleich sind einige aktive Banden durch Pfeile gekennzeichnet.

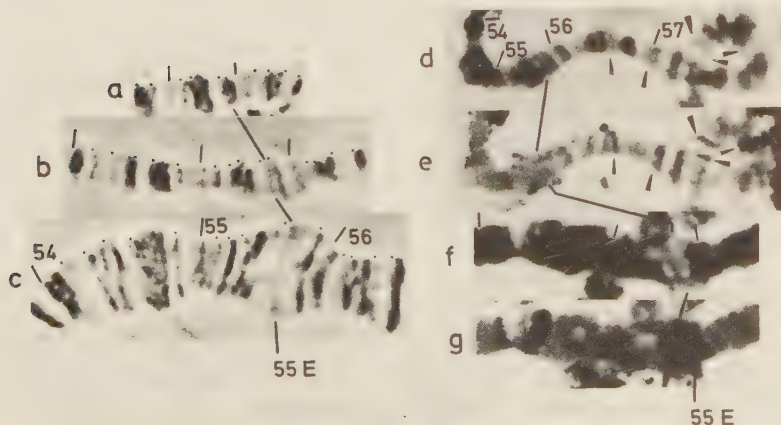
f-g: Chromosom in einem Kern der Speicheldrüse:

f: im Rotfilter;

Soweit möglich, wurden die Grenzen der Chromosomenabschnitte durch Striche markiert.

g: im Grünfilter;

Der Puff 55E ist deutlich ausgeprägt.



D) Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen Einblick in die Natur jener Faktoren zu gewinnen, die in der larvalen Speicheldrüse von *D. virilis* die Aktivität der Puffs in den Riesenchromosomen regulieren. Die Arbeit ist in zwei Teile gegliedert. Im ersten Teil werden die Veränderungen genetischer Aktivität an den Chromosomen im Zusammenhang mit bestimmten entwicklungsphysiologischen Vorgängen untersucht. Im zweiten Teil werden die Ergebnisse von Injektionsexperimenten beschrieben, mit deren Hilfe über die den Veränderungen genetischer Aktivität zugrundeliegenden Regulationsvorgänge einige Aufschlüsse erhalten werden sollten.

Die Ergebnisse waren:

I. Normalentwicklung

- 1) Unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen verlassen die Larven von *D. virilis* 11,2h vor der Pupariumbildung das Futter (= Zeitpunkt des Hochkriechens).
- 2) Mit Hilfe von Schnürungsexperimenten wurde ermittelt, daß 6,6h nach dem Hochkriechen (= n.d.H.) der Ecdyson-titer in der Hämolymphe einen Wert erreicht hat, der nach dem Schnüren auch hinter der Ligatur die Sklerotisierung ermöglicht.
- 3) Im Zeitraum von 8-9h n.d.H. wird der größte Teil des in der zweiten Hälfte des 3. Larvenstadiums gebildeten Sekrets aus den Drüsenzellen in das Lumen abgegeben.
- 4) Im Zeitraum zwischen dem Hochkriechen und der Pupariumbildung wurde in den Riesenchromosomen der Speicheldrüsen an insgesamt 348 Banden genetische Aktivität durch Färbung mit Methylgrün-Pyronin festgestellt. An 319 dieser Banden war im Verlauf dieses Zeitraums eine Änderung der Aktivität zu registrieren, die restlichen Banden veränderten ihre Aktivität nicht.
- 5) Während in den ersten fünf Stunden n.d.H. nur an sechs Banden eine Aktivitätsänderung auftrat, war in dem sich anschließenden Zeitraum bis zur Pupariumbildung eine tiefgreifende Änderung des Aktivitätsmusters des Genoms zu verzeichnen (= puffing-Periode).

- 6) Die puffing-Periode konnte in drei Phasen aufgegliedert werden. Die erste Phase dauert von 5-8h n.d.H. In dieser Phase, in der auch die Ecdysonausschüttung stattfindet, steigt die Anzahl der sich verändernden Banden stark an; es dominiert die Aktivität von Loci, die vor Beginn der puffing-Periode 62% der Gesamtaktivität des Genoms repräsentierten, bis zur Pupariumbildung aber völlig inaktiv werden. In der zweiten Phase, die zwischen 8 und 10h n.d.H. liegt, steigt die Anzahl der sich verändernden Banden weiter an; es dominiert die Aktivität von Loci, die nur während der puffing-Periode aktiv sind. In der dritten Phase schließlich, die eine Stunde vor der Pupariumbildung beginnt, nimmt die Anzahl der sich verändernden Banden wieder ab; es dominiert die Aktivität von Loci, die erst 8h n.d.H. oder noch später aktiv geworden sind. Diese Loci repräsentieren 56% der Gesamtaktivität des Genoms in diesem Zeitabschnitt.
- 7) Vergleicht man die Aktivität des Genoms in der ersten Phase mit derjenigen in der dritten Phase, so zeigt es sich, daß der Aktivitätsanteil eines bestimmten Teils des Genoms in beiden Phasen annähernd gleich groß ist (38 bzw. 44%), während die Aktivität eines bis zur Extrusion des Sekrets aktiven Komplexes von Genen (62%) durch die Aktivität eines völlig anderen Genkomplexes (56%) ersetzt wurde. Diese "Umfunktionierung" des Genoms im Verlauf der puffing-Periode kann im Zusammenhang mit dem Auftreten eines neuen Sekrets stehen, dessen Synthese nach der Pupariumbildung einsetzt. Die Vakuolen, in denen dieses Sekret gespeichert wird, unterscheiden sich morphologisch deutlich von den während des 3. Larvenstadiums gebildeten Sekretgrana. Es ist naheliegend, für die Veränderung der biosynthetischen Leistung der Drüsenzellen die veränderte Aktivität des Genoms verantwortlich zu machen.

II. Injektionsexperimente

- 1) Kombinierte Injektions- und Schnürungsexperimente führten zu dem Ergebnis, daß in Larven, die 4,6-5,6h vor der Ecdysonausschüttung eine Injektion von Kontroll-

puffer erhielten, die Ecdysonausschüttung in den ersten fünf Stunden nach Injektion in einem Grad unterdrückt wurde, daß die Wahrscheinlichkeit der Sklerotisierung hinter der Ligatur beinahe auf Null reduziert wurde.

- 2) Trotz dieser Tatsache wurde in den Speicheldrüsenchromosomen von Larven, die fünf Stunden vorher eine Injektion von Kontrollpuffer erhalten hatten, an 127 Banden eine Veränderung genetischer Aktivität festgestellt, die in der Normalentwicklung nur für die puffing-Periode charakteristisch ist. Man kann daher annehmen, daß diese Veränderungen primär nicht durch Ecdyson, sondern durch andere zellinterne Faktoren gesteuert werden.
- 3) Für diese Interpretation sprechen noch weitere Befunde:
 - a) Von den unter (2) genannten Veränderungen konnten 47 nicht durch Injektion von Ecdyson induziert werden.
 - b) Von allen 87 Veränderungen genetischer Aktivität, die durch Injektion von Ecdyson induziert wurden und die auch in der Normalentwicklung auftraten, konnte es nur für eine einzige wahrscheinlich gemacht werden, daß sie spezifisch durch Ecdyson induziert wird.
 - c) Nach Injektion von H_2O zu einem Zeitpunkt, der die Anwesenheit von Ecdyson praktisch ausschloß, konnte innerhalb von 1 Stunde nach Injektion an 50 Banden eine Änderung der Aktivität festgestellt werden, die in der Normalentwicklung in der puffing-Periode auftrat.
- 4) Die unter (2) genannten Veränderungen wurden fünf Stunden nach Injektion von Lösungen, die kein Ecdyson enthielten, in 31% der Drüsen beobachtet. 52% dieser Veränderungen traten jedoch in allen Drüsen innerhalb von 1 Stunde nach Injektion von Ecdyson auf. Es wird daher postuliert, daß die zellinternen Faktoren, die für diese Veränderungen verantwortlich sind, durch Ecdyson aktiviert werden.
- 5) Während fünf Stunden nach Injektion von Kontrollpuffer der Puff 55E keine signifikante Änderung seiner

Aktivität aufwies, war fünf Stunden nach Injektion von Glucosamin eine deutliche Abnahme seiner Aktivität festzustellen. Dieselbe Abnahme konnte nach Injektion von Ecdyson bereits innerhalb von 1/2 Stunde hervorgerufen werden. Metabolite des Glucosaminstoffwechsels könnten somit in den Kreis jener zellinternen Faktoren gehören, von denen die Aktivität des Genoms gesteuert wird und die durch Ecdyson aktiviert werden.

- 6) Es wird ein Modell diskutiert, nach dem die Aktivität des Genoms mit Faktoren des zellinternen Raums in einem Regulationsgleichgewicht steht. In diesem Modell kommt dem Ecdyson eine Hilfsfunktion zu, indem es einen Teil dieser Faktoren aktiviert und somit zum Zeitpunkt seiner Ausschüttung in die Hämolymphe den Beginn der puffing-Periode in den Chromosomen der Speicheldrüsen induziert. Ein Teil der Veränderungen dieser Periode wird wahrscheinlich auch völlig unabhängig von Ecdyson durch zellinterne Regulationssysteme gesteuert.

Literatur

- (1) F.Jacob, J.Monod. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J.Mol.Biol.* 3, 318-356 (1961).
- (2) J.Monod, J.Wyman, J.P.Changeux. On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J.Mol.Biol.* 12, 88-118 (1965).
- (3) R.T.Schimke, D.Doyle. Control of enzyme levels in animal tissues. *Ann.Rev.Biochem.* 39, 929-976 (1970).
- (4) J.B.Wyngaarden. Genetic control of enzyme activity in higher organisms. *Biochem.Genetics* 4, 105-125 (1970).
- (5) G.L.Zubay. Papers in biochemical genetics. Holt, Rinehart and Winston, Inc., New York (1968), p.465 f.
- (6) R.D.Levere, S.Granick. Control of hemoglobin synthesis in the cultured chick blastoderm. *J.Biol.Chem.* 242, 1903-1911 (1967).
- (7) F.C.Kafatos, J.Reich. Stability of differentiation-specific messenger RNA in insect cells. *Proc. natn.Acad.Sci. U.S.A.* 60, 1458-1465 (1968).
- (8) U.Clever, I.Storbeck, C.G.Roball. Chromosome activity and cell function in polytenic cells. I. Protein synthesis at various stages of larval development. *Expl. Cell Res.* 55, 306-316 (1969).
- (9) K.Scherrer, G.Spohr, N. Granboulan, C.Morel, J. Grosclaude, C. Chezzi. Nuclear and cytoplasmic messenger-like RNA and their relation to the active messenger RNA in polyribosomes of HeLa cells. *Cold Spr.Harb.Symp.Quant.Biol.* 35, 539-554 (1970).
- (10) G.Attardi, H.Parnas, M-I.H.Hwang, B.Attardi. Giant-size rapidly labeled nuclear ribonucleic acid and cytoplasmic messenger ribonucleic acid in immature duck erythrocytes. *J.Mol.Biol.* 20, 145-182 (1966).
- (11) M.Ashburner. Function and structure of polytene chromosomes during insect development. *Adv. Ins.Physiol.* 7, 1-95 (1970).
- (12) C.Pelling. Ribonukleinsäure-synthese der Riesenchromosomen. Autoradiographische Untersuchungen an Chironomus tentans. *Chromosoma* 15, 71-122 (1955).
- (13) H.Bultman, U.Clever. Chromosomal control of foot pad development in *Sarcophaga bullata*. I. The puffing pattern. *Chromosoma* 28, 120-135 (1969).
- (14) H.D.Berendes. Salivary gland function and chromosomal puffing patterns in *Drosophila hydei*. *Chromosoma* 17, 35-77 (1965).
- (15) M.Kodani. The protein of the salivary gland secretion in *Drosophila*. *Proc.natn.Acad.Sci. U.S.A.* 34, 131-135 (1948).
- (16) M.Ashburner und Blumenthal. Nicht veröffentlicht, zitiert in (11).
- (17) E.Perkowska. Some characteristics of the salivary gland secretion of *Drosophila virilis*. *Expl. Cell Res.* 32, 259-271 (1963).
- (18) B.P.Kaufmann, M.McDonalt, H.Gay. Enzymatic degradation of ribonucleoproteins of chromosomes, nucleoli and cytoplasm. *Nature* 162, 814-815 (1948).
- (19) J.Brachet. Biochemical cytology. Academic Press, New York (1957), p. 120 f.

- (20) M.E.Breuer, C.Pavan. Behavior of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7, 371-381 (1955).
- (21) S.Fujii. The salivary gland chromosomes of *Drosophila virilis*. *Cytologia* 7, 272-275 (1936).
- (22) T.C.Hsu. Map of the salivary chromosomes of *Drosophila virilis*; in: J.T.Patterson, W.S.Stone. Evolution in the genus *Drosophila*. The Macmillan Comp. New York (1952).
- (23) R.D.Hughes. An analysis of the chromosomes of two subspecies *Drosophila virilis virilis* and *Drosophila virilis americana*. *Genetics* 24, 811-834 (1939).
- (24) B.Romeis. *Mikroskopische Technik*. R.Oldenbourg Verlag, München, Wien (1968), p. 73 f.
- (25) H.J.Becker. Die Puffs der Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. I.Mitteilung: Beobachtungen zum Verhalten des Puffmusters im Normalstamm und bei zwei Mutanten, giant und lethal-giant-larvae. *Chromosoma* 10, 654-678 (1959).
- (26) M.Ashburner. Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. I. Autosomal puffing patterns in a laboratory stock of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 21, 398-428 (1967).
- (27) H.J.Becker. Die Puffs der Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. II.Mitteilung: Die Auslösung der Puffbildung, ihre Spezifität und ihre Beziehung zur Funktion der Ringdrüse. *Chromosoma* 13, 341-384 (1962).
- (28) M.Ashburner. Induction of puffs in polytene chromosomes of in vitro cultured salivary glands of *Drosophila melanogaster* by ecdysone and ecdysone analogues. *Nature New Biology* 230, 222-223 (1971).
- (29) H.D.Berendes. The hormone ecdysone as effector of specific changes in the pattern of gene activities of *Drosophila hydei*. *Chromosoma* 22, 274-293 (1967).
- (30) L. Sachs. *Statistische Bewertungsmethoden*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (1969).
- (31) W.Beermann. Ein Balbiani-Ring als Locus einer Speicheldrüsenmutation. *Chromosoma* 12, 1-25 (1961).
- (32) U.Grossbach. Chromosomen-Aktivität und biochemische Zelldifferenzierung in den Speicheldrüsen von *Camptochironomus*. *Chromosoma* 28, 136-187 (1969).
- (33) B.M.Slizynski. Functional changes in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Cytologia* 29, 330-336 (1964).
- (34) P.Karlson. Ecdyson, das Häutungshormon der Insekten. *Die Naturwissenschaften* 53, 445-453 (1966).
- (35) C.L.M. Poels. Time sequence in the expression of various developmental characters induced by ecdysterone in *Drosophila hydei*. *Dev.Biol.* 23, 210-225 (1970).
- (36) U.Clever. Genaktivitäten in den Riesenchromosomen von *Chironomus tentans* und ihre Beziehung zur Entwicklung. I. Genaktivierungen durch Ecdyson. *Chromosoma* 12, 607-675 (1961).
- (37) U.Clever. Genaktivitäten in den Riesenchromosomen von *Chironomus tentans* und ihre Beziehungen zur Entwicklung. II. Das Verhalten der Puffs während des letzten Larvenstadiums und der Puppenhäutung. *Chromosoma* 13, 385-436 (1962).

- (38) J.M.Whitten. Coordinated development in the foot pad of the fly *Sarcophaga bullata* during metamorphosis: changing puffing patterns of the giant cell chromosomes. *Chromosoma* 26, 215-244 (1969).
- (39) D.Ribbert. Die Polytänchromosomen der Borstenbildungszellen von *Calliphora erythrocephala*. *Chromosoma* 21, 296-344 (1967).
- (40) L.C.U. Junqueira. Aspects of the biology of the animal cell secretion; in: *Sekretion und Exkretion*, 2. Wissenschaftliche Konferenz der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (1965).
- (41) B.Hess. Koordination von Atmung und Glykolyse; in: *Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle*. Wissenschaftliche Konferenz der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1963).
- (42) H.J.Leenders. Temperature induced puffs in *Drosophila*: their possible physiological origin. *Drosophila Information Service* 46, 64 (1971).
- (43) B. von Gaudecker. Der Strukturwandel im Zytoplasma der larvalen Speicheldrüse von *Drosophila melanogaster* (ein Beitrag zur Frage nach der steuernden Wirkung aktiver Gene). *Z.Zellforsch.* (1971); im Druck.
- (44) W.Baudisch, R.Panitz. Kontrolle eines biochemischen Merkmals in den Speicheldrüsen von *Acricotopus lucidus* durch einen Balbiani-Ring. *Expl. Cell Res.* 49, 470-476 (1968).
- (45) H.Kroeger, M.Lezzi. Regulation of gene action in insect development. *Ann.Rev.Entomology*, 11, 1-22 (1966).
- (46) T.Ohtaki, R.D.Milkman, C.M. Williams. Dynamics of ecdysone secretion and action in the fleshfly *Sarcophaga peregrina*. *The Biological Bulletin* 135, 322-334 (1968).
- (47) E.H.Davidson. Gene activity in early development. Academic Press, New York, London (1968), p. 392 ff.
- (48) C.L.M. Poels. Persönliche Mitteilung (1971).
- (49) U.Clever. Puffing changes in incubated and in ecdysone treated *Chironomus tentans* salivary glands. *Chromosoma* 17, 309-322 (1965).
- (50) H.D.Berendes, J.B.Boyd. Structural and functional properties of polytene nuclei isolated from salivary glands of *Drosophila hydei*. *J.Cell Biol.* 41, 591-599 (1969).
- (51) H.Emmerich. Über die Hämolympfproteine von *Pyrrhocoris apterus* und über die Bindung von Ecdyson durch Hämolympfproteine. *J.Ins.Physiol.* 16, 725-747 (1970).
- (52) H.J.Leenders, G.J.Wullems, H.D.Berendes. Competitive interaction of adenosine 3',5'-Monophosphate on gene activation by ecdysterone. *Expl. Cell Res.* 63, 159-164 (1970).
- (53) H.Kroeger. Gene activities during insect metamorphosis and their control by hormones; in: W.Etkin, L.I.Gilbert. *Metamorphosis, a problem in developmental biology*. Appleton-Century-Crofts, New York (1968), p. 185-219 ff.

- (54) P.S. Chen. Amino acid and protein metabolism in insect development. Adv.Ins.Physiol. 3, 53-132 (1966).
- (55) G. Benz. Quantitative Veränderungen der Aminosäuren und Polypeptide während der Entwicklung von *Drosophila melanogaster*. Arch.d.Julius-Klaus-Stiftung 30, 498-505 (1955).
- (56) C.W.Fuller, E.W.Hanly. Glutamine synthetase activity in *Drosophila melanogaster*. Drosophila Information Service 45, 93-94 (1970).

Lebenslauf

Am 4. Juli 1941 wurde ich als erstes Kind der Eheleute Anneliese und Wilhelm Kreß in München geboren. Nach fünfjährigem Besuch der Volksschule in Freising trat ich 1952 in die Oberrealschule in Freising ein, an der ich im Juni 1961 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1961/62 begann ich an der Universität München mit dem Studium der Naturwissenschaften. Ende des Jahres 1965 stellte mir Herr Prof. Dr. H.J. Becker ein Dissertations-thema, an dessen Ausarbeitung ich seitdem beschäftigt war.

